
Der Einfluss von Kollagenfragmenten auf die Expression von Cathepsinen in osteoarthrotischen Chondrozyten

**Kumulative Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt
dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl.- Biochem. Anke Rüttger (geb. Köcher)

geboren am 14. November 1978

in Jena

Jena, im März 2007

Liste der Gutachter:

- 1. Prof. Bernd Wiederanders (Jena)**
- 2. Dr. habil. Jürgen Mollenhauer (Jena, Tübingen)**
- 3. Prof. Peter Bruckner (Münster)**

Tag der Doktorprüfung: 31. Mai 2007

Tag der öffentlichen Verteidigung: 09. Juli 2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Die degenerative Gelenkerkrankung Osteoarthritis	1
1.1.1 Operative Behandlung	2
1.1.2 Relevanz der Hauptmatrixkomponente Typ II Kollagen	3
1.1.3 Kollagen Typ II-degradierende Enzyme bei der OA	5
1.1.4 Kollagenrezeptoren als Signalgeber für Matrikine	8
1.1.5 Intrazelluläre Signalweiterleitung stromabwärts von Kollagenrezeptoren	12
2 Übersicht zu den Manuskripten	17
3 Manuskripte	21
Rüttger A, Mollenhauer J, Löser R, Gütschow M, Wiederanders B (2006) Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. Veröffentlicht in der Zeitschrift „BioTechniques“ 41(4):469-73.	21
Rüttger A, Wiederanders B (2007) Microplate assay for cathepsin detection in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. Zur Publikation angenommen in "Current Protocols in Protein Science".	22
Rüttger A, Mollenhauer J, Wiederanders B (2007) The role of cathepsins in osteoarthritis: collagen fragments up-regulate cathepsin expression and activity in normal and osteoarthritic chondrocytes by utilizing PKC-dependent signalling. Zur Publikation eingereicht bei der Zeitschrift "Arthritis and Rheumatism"	23
Müller C, Wiederanders B, Fuhrmann R, Venbrocks RA, Rüttger A (2007) Intraartikulärer Schmerz bei Gonarthrose: Ein Fallbericht über eine stark erhöhte Expression der Cathepsine in Chondrozyten. Zur Publikation eingereicht bei der „Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete“	24
4 Diskussion	25
4.1 Weiterentwicklung des Cathepsin-Assays	25
4.2 Verwendetes Untersuchungsmaterial und Methodisches	28

4.3 Sowohl mRNA-Expression als auch Aktivität der Cathepsine B, K und L ist bei der Osteoarthritis erhöht.....	29
4.4 Natürliche und synthetisch hergestellte Kollagenfragmente wirken als Mediatoren einer erhöhten Expression der Cathepsine bei der Osteoarthritis	30
4.5 Die intrazelluläre Signalweiterleitung stromabwärts vom Annexin V beinhaltet den Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration, die Beteiligung von der Proteinkinase C (PKC) und der p38 MAPK	31
4.6 Diskrepanz in der Regulation von Cathepsin H versus Cathepsin B, K und L	33
4.7 Diskrepanz zwischen Klinik und Hypothese – ein Fallbericht.....	34
4.8 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	35
5 Zusammenfassung.....	36
6 Summary	37
7 Literaturverzeichnis	38
8 Danksagung.....	53
9 Erklärungen	54
9.1 Selbstständigkeitserklärung.....	54
9.2 Erklärung zur Dissertation	54
10 Lebenslauf	55
11 Anhang	57
12 Autorenvereinbarungen.....	62

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen – Einleitung

Abb.1: Intraoperativer Situs bei Implantation einer Knie-Totalendoprothese	2
Abb.2: Organisation des Typ-(II)-Kollagen-Moleküls und seiner Fibrillen	4
Abb.3: Schematische Darstellung von Annexin V	9
Abb.4: Struktur und Funktion von Integrinen	11
Abb.5: Schematische Darstellung der Mitglieder der PKC-Familie	13

Abbildungen – Diskussion

Abb.6: Das Prinzip des Cathepsin-Assay	26
Abb.7: Validierung des Cathepsin-Assay	27
Abb.8: Nachweis der Kalziumabhängigkeit des Ntelo-Effektes in Chondrozyten.....	31
Abb.9: Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungen zur Signalweiterleitung am chondrozytenspezifischen Kollagenrezeptor Annexin V.....	33

Abbildungen – Anhang

Abb. A1: Schematische Darstellung der Permutationen der MAPK	57
Abb. A2: Untersuchung zur aktivierenden Wirkung des synthetischen N-Telopeptides des Typ II Kollagen auf die p38 MAPK.....	58

Tabellen – Anhang

Tab. A1: Gene Table: (RT ² Profiler™ PCR Array Human MAP Kinase Signaling Pathway)	59
---	----

Abkürzungsverzeichnis

4-MßNA	4-Methoxy-beta-naphthylamid
C-	carboxy-
CB	Cathepsin B
CH	Cathepsin H
CK	Cathepsin K
CL	Cathepsin L
COL2	Kollagen Typ II
CTX-II, Ctelo	C-Telopeptid des Typ II Kollagens
DAG	Diacylglycerol
DTT	Dithiotreithol
E-64	L-3-Carboxy-2,3-trans-epoxypropanoyl-1-leucylamido-(-4-guanidino)butan
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
Helix-II	Fragment der helikalen Domäne des Typ II Kollagens
k.o.	knockout
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
N-	amino-
NSA	5-Nitrosalicylaldehyd
Ntelo	synthetisches N-Telopeptid des Typ II Kollagens
OA	Osteoarthrose / Osteoarthritis
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
o.g.	oben gezeigt, oben genannt
PKC	Proteinkinase C
RA	Rheumatoide Arthritis
Ras	von <i>Rat sarcoma</i> abgeleitetes kleines G-Protein
RNA	Ribonucleinsäure
SH-Gruppe	Thiolgruppe (oder: Sulfhydrylgruppe)
TEP	Totalendoprothese
TIMP	tissue inhibitor of MMPs
u.a.	unter anderem
WT-	Wildtyp-
Z-	Benzyloxycarbonyl-
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die degenerative Gelenkerkrankung Osteoarthritis

Im Verlauf degenerativer Erkrankungen wie der Osteoarthritis (OA) kommt es zu morphologischen und biochemischen Veränderungen des Knorpels bis zum vollständigen Verschleiß bzw. dem Versagen des Gelenks. Eine allgemein akzeptierte Definition der Osteoarthritis von Küttner und Goldberg lautet wie folgt [Küttner, 1995]:

„Das klinische Bild der Osteoarthritis ist mit Gelenkschmerz, Gelenkempfindlichkeit, Bewegungseinschränkung, Gelenkknirschen, gelegentlichem Anschwellen des Gelenkes und einer zeitweisen Entzündung des Gewebes ohne systemischen Effekt verbunden. Osteoarthrotische Krankheiten sind das Ergebnis von mechanischen und biologischen Ereignissen, die eine Destabilisierung der auf- und abbauenden Prozesse bewirken, an denen die artikulären Chondrozyten, die extrazelluläre Matrix und die subchondralen Knochen beteiligt sind. Die osteoarthrotischen Erkrankungen werden möglicherweise durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst, wie z.B. genetische Prädisposition, traumatische Ereignisse und metabolische oder entwicklungsbedingte Veränderungen. Sie umfassen alle Gewebe eines Gelenkes. Die Erkrankungen manifestieren sich durch morphologische, biochemische, molekulare und biomechanische Veränderungen der Chondrozyten und der extrazellulären Matrix des Knorpels. Als Folge davon kommt es zu einer Erweichung des Knorpels, zu seiner Fibrillierung, zu einer Ulcus-Bildung, zu einem Knorpelverlust, zu einer Sklerosierung und Eburnation der subchondralen Knochen und zur Ausbildung von Osteophyten und subchondralen Zysten.“

Diese Beschreibung belegt, dass für die Entstehung und Progredienz einer solchen Gelenkerkrankung eine Vielzahl von Faktoren bedeutsam sind. Es kommt neben qualitativen Veränderungen zu einer gesteigerten Expression knorpelabbauender Proteinasen sowie einer Verminderung ihrer Inhibitoren. Dieser vermehrten Enzymproduktion liegt auch eine Aktivierung von Chondrozyten zugrunde. Ob diese Aktivierung Ursache oder Folge der Osteoarthritis ist, ist nicht bekannt.

Die Hauptziele einer Therapie sind die Verbesserung der Lebensqualität für den Patienten und die Verzögerung des Fortschreitens der Arthrose. Denn all zu oft bleibt heutzutage dennoch nur der endoprothetische Ersatz des betroffenen Gelenkes.

1.1.1 Operative Behandlung

In unserer älter werdenden Gesellschaft nehmen Arthrosen einen wachsenden Stellenwert im Gesundheitswesen ein [Böhm, 2006]. Sie sind bis heute nicht heilbar. Eine der häufigsten degenerativen orthopädischen Erkrankungen ist die Gonarthrose [Niethard, 2002]. Klinisch dokumentiert sich die Gonarthrose durch den Schmerz, dem zunächst versucht wird mit konservativen Behandlungsmöglichkeiten wie Physiotherapie und der systemischen Gabe von Analgetika/Antiphlogistika beizukommen. Eine anschließende Indikation zur operativen Therapie liegt altersunabhängig bei weiterhin schmerzhaft eingeschränkter Beweglichkeit des Kniegelenks vor [Dt. Gesell. f. Orthopädie, 2002]. Schätzungen gehen davon aus, dass in Deutschland jährlich etwa 55.000-mal die Indikation zur Implantation einer Knieendoprothese gestellt wird [König, 2003]. Alle Gelenkersatzoperationen haben das Ziel einer funktionellen Kompensation. Beim endoprothetischen Gelenkersatz werden die zerstörten Gelenkanteile entfernt und gegebenenfalls unter Korrektur einer Fehlstellung durch künstliche Gelenkteile ersetzt. Prinzipiell lassen sich beide tragenden Gelenkanteile ersetzen (Totalendoprothese). Die nachfolgende Abbildung zeigt den intraoperativen Situs bei Implantation einer Knie-Totalendoprothese.

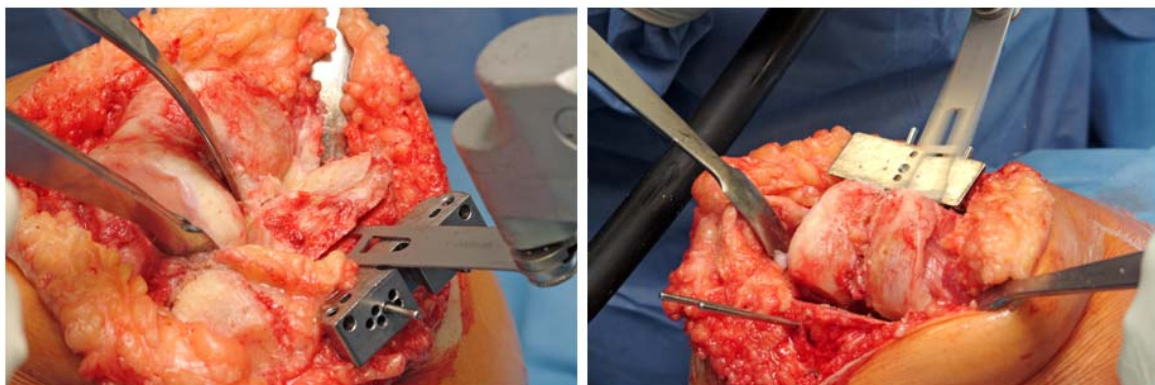


Abb.1: Intraoperativer Situs bei Implantation einer Knie-Totalendoprothese [Quelle: Die Bilder wurden freundlicherweise von Herrn Hardi Hauk, dem Fotografen des Waldkrankenhauses „Rudolf Elle“ gGmbH mit dem Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Eisenberg zur Verfügung gestellt.].

Bei der Implantation einer Knie-Totalendoprothese wird zunächst das Tibiaplateau (linkes Bild) und anschließend die Femurkondylen (rechtes Bild) reseziert. Bei dieser endoprothetischen Versorgung werden die Bandstrukturen erhalten. Die Resektate stellen ein ideales Untersuchungsmaterial zur Erforschung der OA dar.

Die Substitution nur eines Gelenkanteils ist ebenfalls möglich. Dabei werden nur die tragenden Elemente eines Femurkondylus und der korrespondierenden Tibiakopfhälfte reseziert und künstlich mit einer Schlittenprothese substituiert. Künstliche Gelenke sind als Langzeitimplantate konzipiert und bewährt.

Neben den positiven Effekten einer Verbesserung der Lebensqualität (Schmerz- und Gehfähigkeitsverbesserung) muss dennoch konstatiert werden, dass die ursprüngliche individuelle Kinematik eines Kniegelenks durch eine Knieprothese nicht exakt rekonstruiert werden kann [Niethard, 2002]. Der gesunde Gelenkknorpel bleibt in seiner Funktionalität unübertroffen. Da gesunde Gelenke neben ihrer reibungslosen Gleitfähigkeit auch hochbelastbar und stoßdämpfend-elastisch sein müssen, werden an den hyalinen Knorpel hohe Anforderungen gestellt. Demen wird er aber in geradezu idealer Weise gerecht. Er besteht aus einem Kollagenfasergerüst, aus einer homogenen Zwischensubstanz, den Proteoglykanen und aus den Chondrozyten, die die beiden erstgenannten Stoffe synthetisieren [Horton, 1993]. Sein Aufbau, die Bestandteile seiner Matrix und seine spezifischen Zellen machen den Knorpel zu einem speziellen Gewebe mit ganz besonderen biomechanischen Eigenschaften, die es ihm ermöglichen, seine Funktion zu erfüllen. Deshalb ist nachfolgend die (patho-)physiologische Bedeutung der Hauptmatrixkomponente im Knorpel, des Typ II Kollagen, dargestellt.

1.1.2 Relevanz der Hauptmatrixkomponente Typ II Kollagen

Die extrazelluläre Matrix wird hauptsächlich von Kollagenen und Proteoglykanen gebildet. Daneben kommen noch andere Matrixproteine vor, von denen an dieser Stelle nur das Fibronektin und das „Cartilage Oligomeric Protein (COMP)“ erwähnt werden. Im artikulären Knorpel repräsentieren die Kollagene mehr als 50% des organischen Trockengewichtes. Etwa 90% des wasserunlöslichen Kollagenfasergerüsts werden vom Kollagen Typ-(II)-Protein gebildet, das ansonsten nur selten in anderen Geweben vorzufinden ist [Horton, 1993]. Typ-(II)-Kollagen-Moleküle bestehen aus drei identischen α -1-(II)-Polypeptidketten, die jeweils etwa 300 nm lange Tripelhelices mit kurzen Telopeptiden an ihren Enden bilden. Sie werden im Knorpel zu langen Fibrillen angeordnet, in denen einzelne Helices über intermolekulare Quervernetzungen der Lysin- und/oder Hydroxylysinseitenketten miteinander verbunden sind. Über das Protein Anchorin CII (Annexin V) werden die Typ-(II)-Kollagene an der Oberfläche von Chondrozyten verankert, wodurch eine Interaktion zwischen Matrix und Zellen ermöglicht wird [von der Mark, 1985]. Die restlichen 10% der Kollagene bilden andere Typen wie z.B. Typ-(IX)- und -(XI)-Kollagene [Mendler, 1989; Eyre, 1991]. Dabei trägt Typ-(IX)-Kollagen zu einer Verstärkung der mechanischen Stabilität des Kollagengeflechtes bei [Horton, 1993]. Die Abbildung 2 zeigt den Aufbau des fibrillenbildenden Typ-(II)-Kollagen-Moleküls. Die drei Polypeptidketten weisen große Domänen auf, die aus repetitiven Gly-X-Y-Sequenzen bestehen, wobei X häufig Prolin oder Hydroxyprolin, Y häufig Glyzin repräsentiert. Das regelmäßige Auftreten von Glyzin im Bereich der helikalen Struktur bedingt die innere Enge der Tripelhelix, deren „Seitenkette“ nur aus einem Wasserstoff

besteht. Die Prolin- und Hydroxyprolinreste stabilisieren die Tripelhelix dadurch, dass sich ihre Pyrrolidinringe gegenseitig ausweichen, so dass der Peptidkette nur eine geringe Drehung in sich möglich ist. Der Stickstoff in Prolin hat durch die Ringbildung weniger Freiheitsgrade. Dadurch wird die Kollagenhelix starrer. Außerdem erhöht die Hydroxylierung vom Prolin die Zahl der möglichen Wasserstoffbrücken. Deshalb ist die Reifung des Kollagens bei Vitamin C-Mangel (Skorbut) gestört.

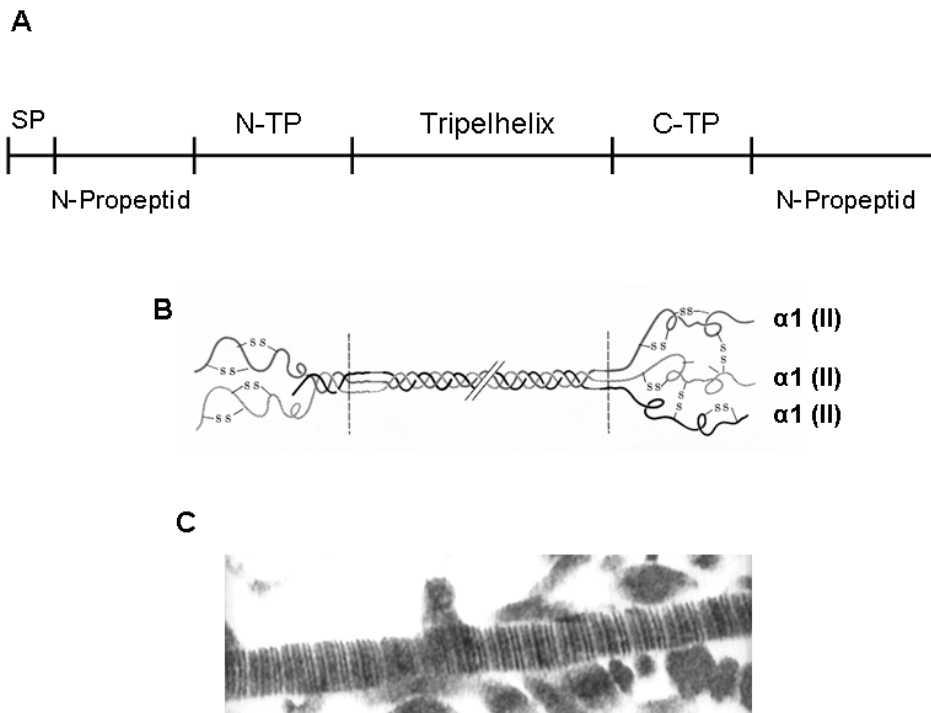


Abb. 2: Organisation des Typ-(II)-Kollagen-Moleküls (A, B) und seiner Fibrillen (C) [Quelle: Forschungsabteilung am Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ gGmbH mit dem Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Eisenberg].

Die Teile A und B zeigen den schematischen Aufbau des Kollagen Typ II Moleküls. Der Teil C zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme (von C. Müller, eigene Arbeitsgruppe) einer Kollagenfibrille im Knorpel. Die helikale Domäne des Typs II Kollagen besteht aus 1017 Aminosäuren (AS), während das N-Telopeptid und das C-Telopeptid nur aus 19 beziehungsweise 24 AS aufgebaut sind. SP: Signalpeptid, TP: Telopeptid, N: aminoterminal, C: carboxyterminal.

Die Synthese des Prokollagens vom Typ II findet intrazellulär am rauen endoplasmatischen Retikulum statt. Dort und im Golgi-Apparat wird es glycosyliert, wobei Galactose- und Glucosemoleküle an Hydroxylysinreste sowie lange Oligosaccharide an bestimmte Asparaginreste angeheftet werden. Die Abspaltung der amino (N)- und carboxy (C)-terminalen Propeptide und der daraus resultierenden Umwandlung zu funktionellen Kollagenmolekülen erfolgt dagegen extrazellulär. Neben helikalen Domänen weisen Tropokollagenmoleküle auch nicht-helikale Abschnitte auf. Diese befinden sich sowohl am Amino- als auch am Carboxyl-Ende der Peptidketten und werden als Telopeptide bezeichnet.

Der Anteil der Chondrozyten, einziges zelluläres Element im Knorpel, variiert in den unterschiedlich strukturierten Zonen des Gelenkknorpels. Er beträgt zwischen 1 bis 10% der gesamten Knorpelmasse. Knorpel ist somit ein relativ zellarmes Gewebe [Horton, 1993].

Die Hauptmatrixkomponente Kollagen Typ II ist keineswegs inert, sondern unterliegt einem kontinuierlichen Umsatz. Synthese und Degradation befinden sich normalerweise in einem dynamischen Gleichgewicht. Generell sind Kollagenfragmente deshalb ein natürlicher Bestandteil des Gelenkknorpels (ca. 3% der Gesamtmasse an Kollagen). Sie können bei der Osteoarthritis, bei ihr überwiegen die katabolischen Prozesse, im Endstadium bis zu 20% der Gesamtmasse an Kollagen betragen [Hollander, 1995; Billingham, 1997]. Verschiedene Studien zeigten, dass die Abbaufragmente vom Typ II Kollagen eine verstärkte Synthese von Matrixmetalloproteinasen, wie MMP-3 und MMP-13, induzieren und somit möglicherweise einen Circulus vitiosus auslösen können [Jennings, 2001; Pelletier, 2005; Fichter, 2006]. MMP-3 (Stromelysin) ist nämlich in der Lage, dass C- und das N-Telopeptid vom Typ II Kollagen abzuspalten [Jennings, 2001]. Es setzt damit Peptide frei, die die MMP3-Synthese steigern und damit den Kollagenabbau beschleunigen. Weiterhin beschrieben Mollenhauer et al., dass eine Entfernung des N-Telopeptides die Bindung von Typ II Kollagen an Chondrozyten inhibiert [Mollenhauer, 1984].

Aurich et al. beschäftigten sich mit der Lokalisierung dieser Fragmente im Knorpel [Aurich, 2002] und zeigten, dass die Chondrozyten mit Kollagenfragmenten kolokalisiert sind. Zusammen führten diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass für die Bindung des Typ II Kollagens und seiner Abbauprodukte an Chondrozyten das N-Telopeptid eine wesentliche Rolle spielen könnte. Daraus ergibt sich die Frage nach involvierten Kollagenrezeptoren. Die Antwort auf diese Frage wird im Folgenden noch Gegenstand der Betrachtungen sein.

Routinemäßig werden Fragmente des (Pro-)Kollagen Typ II als diagnostischer Standard-Serumtest als ein Maß für die Geschwindigkeit des Kollagenumsatzes im Körper eingesetzt. Die Analyse der Kollagen Typ II Synthese, respektive der Synthese der Knorpelmatrix, erfolgt durch Detektion des Prokollagen Typ II C-Propeptids, das während der Prozessierung von Tropokollagen proteolytisch abgespalten wird [Lohmander, 1996]. Die Degradation des Typ II Kollagen kann mit einem Inhibitions-ELISA detektiert werden, welcher das durch Kollagenaseeinwirkung entstandene Neoepitop COL2-3/4 C_{short} erkennt [Billingham, 2000].

1.1.3 Kollagen Typ II-degradierende Enzyme bei der OA

Die Degradation des Typs II Kollagen im Knorpel ist ein wesentliches Merkmal in der Pathogenese der OA. Deshalb sollen hier die Enzyme näher charakterisiert werden, die in der Lage sind Kollagenabbaufragmente zu generieren.

Im Knorpel sind zwei Gruppen von proteolytischen Enzymen dazu befähigt Typ II Kollagen zu spalten. Zur ersten Gruppe gehören sezernierte oder membrangebundene Matrix-Metalloproteinasen, vor allem die MMP-3, -9 und -13 [Jennings, 2001; Fichter 2006]. Bei den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) handelt es sich um eine Großfamilie von mindestens 25 Enzymen. Sie benötigen Zink für ihre katalytische Funktion und Kalzium für ihre strukturelle Stabilität. Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) werden u.a. von den Chondrozyten in inaktiver Form synthetisiert, extrazellulär deponiert und im Bedarfsfall aktiviert. Die Inhibition der MMPs erfolgt durch sogenannte TIMPs (*Tissue Inhibitors of MMPs*) und durch α 2-Makroglobulin [Coussens, 2002]. Kein TIMP wird vom Chondrozyten selbst synthetisiert, sondern sie werden passiv aus dem Blutplasma aufgenommen und an Proteoglykanen absorbiert gelagert. Daher führt ein Verlust von Proteoglykanen automatisch zum Verlust der Inhibition von Proteasen. Die Regulation der MMPs unterliegt einer sehr komplexen Kontrolle und ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und ihren Inhibitoren zugunsten der MMPs wird als beitragender Faktor zur Pathogenese der Osteoarthritis betrachtet [Keyser, 1998; Davidson, 2006]. Die Bedeutung der Metalloproteinasen für die Osteoarthritis wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht [Jennings, 2001; Fichter, 2006; Milner, 2006; Murphy, 1993; Okada, 2000].

Zu der zweiten Gruppe von kollagenolytisch aktiven Enzymen gehören Vertreter der Papain-Superfamilie Cathepsin B, Cathepsin K und Cathepsin L. Die einzige lysosomale Aminopeptidase Cathepsin H besitzt diese Fähigkeit nicht. Im aktiven Zentrum aller Cysteinproteasen befindet sich ein Cysteinrest, der eine nukleophile SH-Gruppe trägt. Für die Ausbildung des für die Katalyse essentiellen Thiolatanions (S^-) aus der SH-Gruppe des Cysteins bedarf es der Bildung einer Ionenbindung zwischen dem Cystein und der basischen Aminosäure Histidin. Diese katalytische Diade wird um einen Asparaginrest zur Ausrichtung des Imidazolrings des Histidins zu einer katalytischen Triade erweitert [Kirschke, 1998].

Zum Nachweis der Aktivität der Cathepsine *in vitro* werden u.a. synthetische Peptide eingesetzt, die mit Farb- bzw. Fluoreszenzmolekülen gekoppelt sind. Die Mitglieder der Papain-Superfamilie werden durch E-64 rasch, spezifisch und irreversibel gehemmt [Kirschke, 1998]. Peptidyl Diazomethane, die Peptidaldhyde Leupeptin und Antipain sind weitere Inhibitoren der Cysteinproteasen [Kirschke, 1998]. Als endogene, reversible und kompetitive Inhibitoren der Cysteinproteasen sind Cystatine, Stefine und Kininogene zu nennen [Abrahamson, 1994; Lenarcic, 1996].

Lange wurde angenommen, dass Cathepsine nur in Lysosomen wirkende Enzyme sind, die den unspezifischen Endabbau von Proteinen im sauren Kompartiment katalysieren. Darüber hinaus sind sie aber an einer Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt. Die Erzeugung von *knockout*-Mausstämmen, die für bestimmte Cathepsin-Gene defizient sind, hat entscheidend zur Aufklärung der *in vivo* Funktionen von Cathepsinen und deren kausale Bedeutung für Krankheiten beigetragen. Für die in dieser Arbeit betrachteten

Cathepsine B, H, K und L existieren *knockout*-Mauslinien. CB-defiziente Mäuse entwickeln sich normal und zeigen keinen auffälligen Phänotyp. Es ist anzunehmen, dass andere Cysteinproteasen die Abwesenheit von Cathepsin B kompensieren. Dennoch konnte gezeigt werden, dass CB an Apoptosevorgängen in der Leber [Guicciardi, 2000] und an der Entstehung der akuten Pankreatitis beteiligt ist [Halangk, 2000].

Der auffällige Phänotyp bei CL-defizienten Mäusen ist von periodischem Haarverlust gekennzeichnet [Roth, 2000]. Untersuchungen identifizierten für Cathepsin L die Beteiligung bei der Antigenpräsentation. Vor dem Hintergrund der Erforschung degenerativer Erkrankungen konnten verschiedene Arbeitsgruppen ein erhöhtes Expressionsniveau von Cathepsin B und L in Synovialflüssigkeiten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) nachweisen [Hansen, 2000; Hashimoto, 2001].

Cathepsin K wird in Osteoklasten hoch exprimiert und hat eine wichtige Funktion bei der Knochenresorption [Bossard, 1996; Drake, 1996; Xia, 1999]. Bei Cathepsin K-defizienten Mäusen wird eine ausgeprägte Osteopetrose beobachtet, die durch die fehlende Osteoklasten-Aktivität verursacht wird [Gowen, 1999; Saftig, 1998]. Bei der autosomal vererbten Pyknodystose konnten Mutationen im CK-Gen als Ursache des Funktionsverlustes des Enzyms identifiziert werden. Das führt zu einer vermehrten Knochenmasse sowie zur Deformität der Knochen [Gelb, 1996; Fratzi-Zelman, 2004]. Umgekehrt führt die Überexpression von CK zu einem krankhaft vermehrten Knochenabbau bei der Osteoporose [Yasuda, 2005].

Cathepsin H-defiziente Mäuse zeigen keinen Phänotyp [persönliche Mitteilung, T. Reinheckel]. Interessanterweise sind die Cathepsine B, H, K und L auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert (CB: 8p22-p23.1; CH: 15q24-q25; CK: 1q21; CL: 9q21-q22) [Kirschke, 1998]. In diesem Zusammenhang postulierten Turk et al., dass sich die für Cathepsine kodierenden Gene aus einem gemeinsamen Vorläufergen entwickelt haben sollen [Turk, 2000]. Die breite Streuung der Cathepsin-Gene über das gesamte humane Genom soll dann durch Genduplikation und Transpositionsergebnisse erklärt werden können [Barrett, 1998].

Zusammenfassend zeigt sich immer deutlicher, dass Cathepsine spezifische Aufgaben bei dem Umbau der extrazellulären Matrix übernehmen. Bailey et al. postulieren, dass die Cathepsine B und L fähig sind, die nicht-helikalen Regionen (Telo peptide) von fibrillärem Kollagen zu spalten [Bailey, 2000]. Und Cathepsin K ist in der Lage natives Kollagen, respektive die unlösliche Kollagentripelhelix, abzubauen. Dazu bildet es kollagenolytisch hoch aktive Komplexe mit Glucosaminoglykanen (z.B. Chondroitinsulfat, Keratansulfat) [Li, 2000; Li 2004]. Kontinen et al. und Morko et al. wiesen eine Beteiligung von Cathepsin K bei der Degradation des Knorpels bei der OA nach [Kontinen, 2002; Morko, 2004]. Deshalb könnte die gezielte Hemmung der Cathepsine Hilfe versprechen bei verschiedenen degenerativen Erkrankungen wie Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis.

Die therapeutische Inhibition setzt jedoch spezifische Kenntnisse über den Wirkmechanismus voraus. Aus diesem Grund werden nachfolgend wichtige Anmerkungen zur Interaktion von Kollagenabbaufragmenten mit Rezeptoren gemacht.

1.1.4 Kollagenrezeptoren als Signalgeber für Matrikine

Durch proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix werden Matrixfragmente generiert. Sie fungieren als extrazelluläre Signale und werden als Matrikine bezeichnet. Die Bedeutung der Interaktion von Chondrozyten mit Typ II Kollagen als Hauptmatrixkomponente ist bereits beschrieben: Yang et al. zeigten, dass die Ausschaltung des Kollagen Typ II-Gens zur Apoptose der Chondrozyten führte [Yang, 1997]. Deshalb sollen nachstehend die Rezeptoren beschrieben werden, die zur Bindung von Typ II Kollagen befähigt sind. Diese Eigenschaft ist in der Literatur für das Annexin V und für Integrine beschrieben [Mollenhauer, 1983; Salter, 1992, Reid, 2000].

Annexin V. Die Degradation des Typ II Kollagens resultiert u.a. in der Abspaltung der Telopeptide von der helikalen Domäne. Die entstehenden Fragmente sind ebenfalls Liganden von Kollagenrezeptoren. Mollenhauer et al. isolierten aus Chondrozyten mittels Affinitätschromatographie (Typ II Kollagen-Sepharose) ein hydrophobes an Typ II Kollagen bindendes Glykoprotein. Aufgrund seiner Eigenschaften (**anchoring of chondrocytes to type II collagen**) wurde es Anchorin CII genannt [Mollenhauer, 1983]. Spätere Untersuchungen identifizierten es als Annexin V. Mit einem Bindungsassay konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten auf mit Typ II Kollagen-beschichteten Platten adhärieren. Eine Inkubation mit Anti-Anchorin CII-Antikörpern führte zu einer 50%igen Inhibition der Bindung [Mollenhauer, 1984]. Diese Arbeiten gaben damit erste Hinweise auf die Funktion des Annexin V (bzw. Anchorin CII) als Kollagenrezeptor. Sie zeigten aber auch, dass es weitere Rezeptoren für Kollagen Typ II geben muss. Zahlreiche Untersuchungen über die Annexine, ihre Aufgaben und ihren Aufbau folgten in den darauffolgenden Jahren. Man fand heraus, dass die Annexine eine Familie hochkonservierter Proteine sind. Sie teilen die Fähigkeit in Gegenwart von Kalzium an Phospholipide, respektive an Bestandteile von Membranen, binden zu können. Sie sind Mitglieder einer evolutionär konservierten Multigen-Proteinfamilie, die sowohl im tierischen als auch pflanzlichen Organismus exprimiert werden. Mindestens zehn verschiedene Mitglieder sind in Säugetieren identifiziert worden. Neben verschiedensten biologischen Funktionen wird heute vor allen Dingen eine regulatorische Rolle der Annexine im intrazellulären Vesikeltransport diskutiert [Gerke, 2002]. Dem Annexin V im Knorpel wird eine Schlüsselposition bei der Kommunikation zwischen der extrazellulären Matrix und den Chondrozyten zugeschrieben. Konzentriert man sich auf die Bedeutung von Annexin V als Signalgeber, so wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen die Rolle von Annexin V als ein zur Bindung von Typ II Kollagen befähigter Kalziumionkanal im Knorpel unterstrichen

[Lucic, 2003]. Beispielsweise führte die Überexpression von Annexin V in normalen Chondrozyten zu einer Erhöhung des zytosolischen Kalziums [Zuscik, 2003]. Immunhistochemische Studien zur gewebespezifischen Funktion von Annexin V als Kollagenrezeptor in Chondrozyten zeigten eine signifikant erhöhte Expression im OA-Knorpel im Vergleich zum adulten, gesunden Knorpel [Mollenhauer, 1999].

Strukturelle Untersuchungen von Huber et al. ergaben, dass Annexin V aus einem konservierten Proteinkern und einem kurzen, variablen Anteil bestehen. Mit Ausnahme von Annexin VI besteht der Proteinkern aller Annexine aus vier homologen „Core“-Domänen von jeweils 70-80 Aminosäuren. Im Zentrum der vier Domänen von Annexin V befindet sich eine hydrophile Pore. Eine Annexin-Domäne besteht aus fünf α -Helices (A-E), welche durch kurze Schleifen miteinander verbunden sind [Huber, 1990]. Aus der Abbildung 3 ist der Aufbau des Kollagenrezeptors Annexin V ersichtlich.

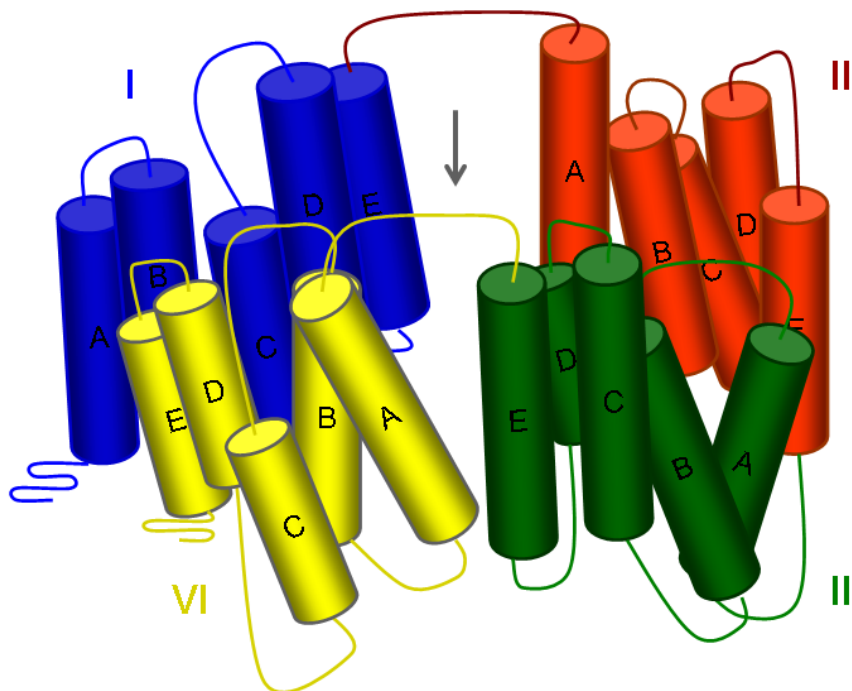


Abb. 3: Schematische Darstellung von Annexin V [modifiziert nach Huber].

Die vier Kerndomänen (Domäne I: blau, Domäne II: rot, Domäne III: grün und Domäne IV: gelb) setzen sich aus je fünf α -Helices (A-E) zusammen. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Domänen I/IV und II/III sorgen für eine enge Interaktion der Segmente. Im Zentrum der zyklich angeordneten Domänen findet sich eine hydrophile Pore (grauer Pfeil). Diese Pore fungiert als Ca^{2+} -Kanal.

Die Bedeutung der Telopeptide bei der Bindung von Typ II Kollagen an Annexin V belegten auch die Arbeiten von Kirsch und Pfäffle [Pfäffle, 1988; Kirsch, 1993]. Ihren Untersuchungen zufolge bindet Annexin V an die Telopeptid-Region des Typ II Kollagens. Denn die Entfernung der Telopeptide senkte die Bindung von Annexin V an Typ II Kollagen um 60 Prozent [Kirsch, 1992]. Zudem konnte gezeigt werden, dass nach Spaltung von nativem Typ II

Kollagen mit Kollagenase nur das N-terminale Fragment an Annexin V bindet [Lucic, 2003]. Diese Studien zu dem knorpelspezifischen Kollagenrezeptor Annexin V untermauern die Bindung des N-Telopeptides des Typ II Kollagen an den Kalziumkanal. Weiterführende Betrachtungen zur intrazellulären Signalweiterleitung, die sich aus der resultierenden Erhöhung des zytosolischen Kalziumspiegels ergeben, sind in der Literatur bis jetzt noch nicht beschrieben.

Integrine. Der Proteinfamilie der Integrine kommt eine zentrale Rolle als Mittler von Adhäsionsprozessen zu. Sie vermitteln zum einen die Interaktion der Zellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix [Hynes, 1992] und sind zum anderen auch an der Bildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt. In dieser Funktion als Zelladhäsionsmoleküle sind sie an der Zytoskelettorganisation, Proliferation und Apoptose beteiligt [Hynes, 2002].

Diese integralen Membranproteine bestehen aus zwei Polypeptidketten, einer α - und einer β -Untereinheit, die nicht kovalent miteinander verbunden sind. Zurzeit sind mindestens 24 verschiedene Integrinrezeptoren bekannt, die durch die Kombination von 18 unterschiedlichen α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten entstehen [Giancotti, 1999]. Darüber hinaus führt alternatives Spleißen der Integrin-mRNAs zu weiteren Variationen der α - und einer β -Untereinheiten [de Melker und Sonnenberg, 1999]. Der strukturelle Aufbau von Integrinen und deren Funktion bei der Vermittlung von Zell-Matrix-Wechselwirkungen ist in Abbildung 4 aufgezeigt.

Eine Kombination der verschiedenen Untereinheiten gewährleistet trotz vorhandener struktureller Gemeinsamkeiten, dass jeder Vertreter seine eigene, spezifische Funktion zu haben scheint. Die Bindung der unterschiedlichen Substrate erfolgt über die extrazelluläre Domäne der transmembranen Integrine, die aus den N-Termini der α - und einer β -Untereinheit besteht. Mit der zytoplasmatischen Domäne der Integrine sind verschiedene Proteine assoziiert. Zum einen binden Zytoskelett-assoziierte Proteine wie α -Aktinin, Talin und Vinculin. Zum anderen ist der aktivierte Rezeptor befähigt, das Signal an verschiedene assoziierte Tyrosinkinasen (z.B. FAK: „*Focal adhesion kinase*“, Src: *Name ist abgeleitet von Rous sarcoma virus*) weiterzugeben. Die nachgeschalteten Effektorproteine (PLC γ : Phospholipase C γ , Grb2: Growth factor receptor binding protein 2) ermöglichen u.a. die Anbindung an die MAPK-Kaskade [Krauss, 2003].

Interessanterweise sind Integrine aufgrund der bidirektionalen Signalübertragung wichtige Werkzeuge zur Zusammenführung intrazellulärer und extrazellulärer Signale. Beim *Outside-in Signaling* führt die Ligandenbindung zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege (u.a. die bereits erwähnte Anbindung an die MAPK-Kaskade). Hingegen wird das *Inside-out Signaling* dadurch charakterisiert, dass Signale anderer Rezeptoren intrazelluläre

Signalwege auslösen, welche so auf die zytoplasmatischen Domänen der Integrine einwirken, dass die extrazellulären Domänen für eine Ligandenbindung aktiviert.

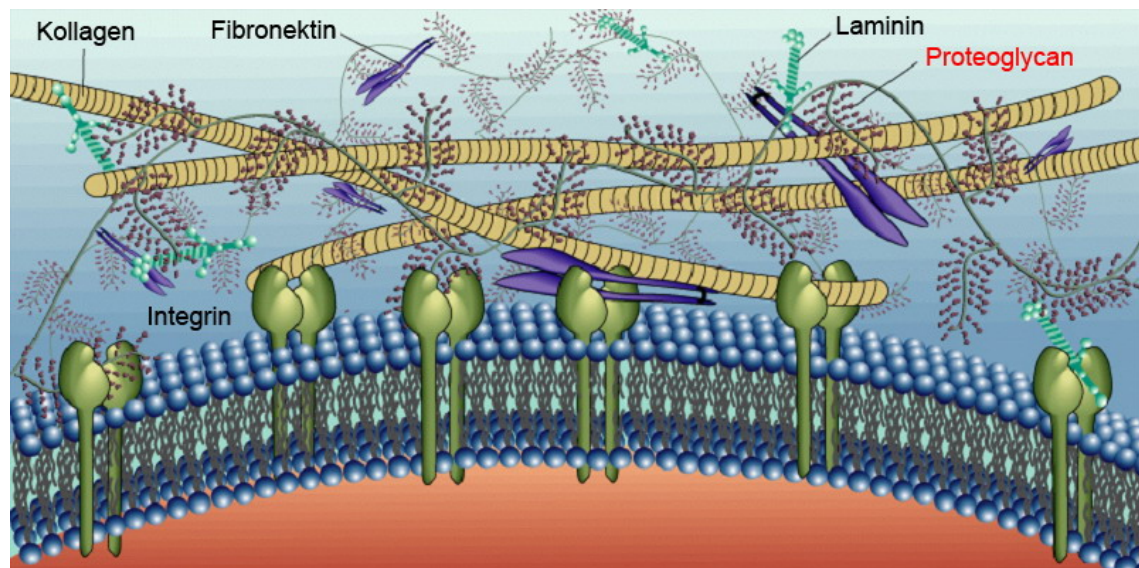


Abb. 4: Struktur und Funktion von Integrinen. [übernommen von: medd.klinikum.uni-muenster.de/.../Abb.1.jpg] Als Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix sind u.a. Kollagen, Fibronectin, Laminin und Proteoglykan zu nennen. Den heterodimeren Integrin-Rezeptoren ($\alpha\beta$) wird u.a. die Rolle eines Mittlers bei Zell-Matrix-Wechselwirkungen zugeschrieben.

Integrine konnten auch im Knorpel nachgewiesen werden [Durr, 1993; Enomoto, 1993; Salter, 1992]. Speziell die $\beta 1$ -Integrine werden in Chondrozyten exprimiert und waren Gegenstand von verschiedenen Untersuchungen. So führte beispielsweise eine anti- $\beta 1$ -Integrin Behandlung zur Inhibierung der Bindung zwischen Typ II Kollagen und Chondrozyten [Knudson, 2002].

Der mengenmäßig am häufigsten vorkommende $\alpha 5 \beta 1$ -Integrinrezeptor bindet Fibronectin-Fragmente. Diese Bindung reguliert den Chondrozyten-Metabolismus und bewirkt eine verstärkte Synthese von matrixabbauenden Enzymen. Dadurch wird die Chondrolyse, d.h. eine verstärkte Matrixdegradation, ausgelöst [Homandberg, 2002]. Kollagenbindende Integrine wie $\alpha 1 \beta 1$ und $\alpha 2 \beta 1$ sind im Knorpel weniger prominent als der beschriebene Fibronectin-Rezeptor. Untersuchungen zeigten, dass sie jedoch mit länger anhaltenden Monolayer-Kultur-Zeiten verstärkt exprimiert werden [Goessler, 2005; Reid, 2000]. Diese Arbeiten sind von vorrangigem Interesse auf dem Gebiet des Tissue Engineering von Knorpel. Das Phänomen der Dedifferenzierung von Chondrozyten nach Isolation aus der natürlichen Knorpelmatrix ist weiterhin charakterisiert durch eine reduzierte Synthese von Typ II Kollagen und Proteoglykanen. Derzeit wird versucht, der Dedifferenzierung zum einen durch Wiederherstellung des differenzierten Phänotyps, durch Nachahmung der natürlichen Matrix beizukommen [Goessler, 2005]. Zum anderen werden große Anstrengungen unternommen,

um mit Hilfe der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen einen differenzierten Chondrozyten-Phänotyp zu erreichen [Kafienah, 2007].

Insgesamt spiegeln die Betrachtungen der unterschiedlichen Rezeptoren im Knorpel die herausragende Bedeutung des Annexin V in der natürlichen Matrix wider. Deshalb soll im folgenden Abschnitt auf mögliche Komponenten der intrazellulären Signalweiterleitung, die stromabwärts dem Annexin V folgen, eingegangen werden.

1.1.5 Intrazelluläre Signalweiterleitung stromabwärts von Kollagenrezeptoren

Die intrazelluläre Signalweiterleitung stromabwärts von Kollagenrezeptoren wie Annexin V ist bislang wenig untersucht. Lucic et al. konnten zeigen, dass die Bindung von Ntelo (dem N-terminalen Telopeptid des Typ II Kollagen) an den Kollagenrezeptor Annexin V eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration bewirkt [Lucic, 2003]. Als Folge dessen werden weitere Reaktionen in der Zelle initiiert. Als ein Beispiel für ein Ca^{2+} -reguliertes Enzym soll an dieser Stelle die Proteinkinase C näher charakterisiert werden. Da eine Aktivierung der PKC, sowie zahlreiche weitere Signalwege an der Aktivierung der MAP-Kinase-Wege beteiligt sein könnten, sollen diese ebenfalls Gegenstand der Betrachtungen sein.

Proteinkinase C. Der Proteinkinase C kommt aufgrund der Vielfalt der von ihr vermittelten Prozesse und der Vielzahl der Signale, die zur PKC-Aktivierung führen können, ein breites Interesse zu. Die PKC wurde ursprünglich nicht als Enzymfamilie sondern als einzelne Kinase beschrieben, die durch Proteolyse, Phospholipide und Ca^{2+} aktivierbar ist [Krauss, 2003]. In der Folge zeigte sich jedoch, dass PKC eine Familie von ubiquitären Serin-/Threonin-Kinasen bildet. Alle Mitglieder dieser Familie bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette. Diese bildet zwei durch eine bewegliche Region (Scharnierregion) verbundene Domänen: eine N-terminale regulatorische Domäne und eine C-terminale katalytische Domäne. Die Klonierung und Sequenzierung der ersten Isoenzyme zeigte vier konservierte Bereiche (C1-C4), die von fünf variablen Bereichen flankiert sind [Coussens, 1986]. Abbildung 5 zeigt die daraus resultierende Unterteilung in die PKC-Subfamilien.

Die konstanten Bereiche der C-terminalen katalytischen Domäne aller PKC-Isoenzyme sind homolog und enthalten den ATP-Bindungsbereich (C3) zusammen mit der Substratbindungsstelle (C4), die auch das aktive Zentrum enthält. Dagegen weisen die einzelnen Bereiche der regulatorischen Domänen der verschiedenen PKC-Isoenzyme deutliche Unterschiede auf. Zu den konventionellen PKCs zählen die Isoenzyme PKC α , PKC β I, PKC β II und PKC γ . In ihnen enthält der erste dieser Bereiche ein dupliziertes cysteinreiches Motiv (C1-C1), woran Diacylglycerol (DAG) oder Phorbol ester binden können. N-terminal an dieses

schließt sich eine autoinhibitorische Pseudosubstratsequenz an [Parker, 2003]. Der zweite konstante Bereich (C2) enthält die Bindungsstelle für saure Lipide und Kalzium [Parker, 2003]. An die neuen (nPKC) und atypischen (aPKC) PKC-Isoformen erfolgt aus unterschiedlichen Gründen keine Bindung von Kalzium. Den nPKCs fehlen die zur Ca^{2+} -Bindung notwendigen Aspartatreste im C2-Bereich. Dagegen fehlt der C2-Bereich in den aPKCs vollständig. Aufgrund der strukturellen Besonderheiten der PKC μ (Proteinkinase D), ein auseinandergezogener C1-Bereich, fehlender C2-Bereich und weitere Strukturelemente, kann diese PKC in keine der genannten Subfamilien eingeordnet werden.

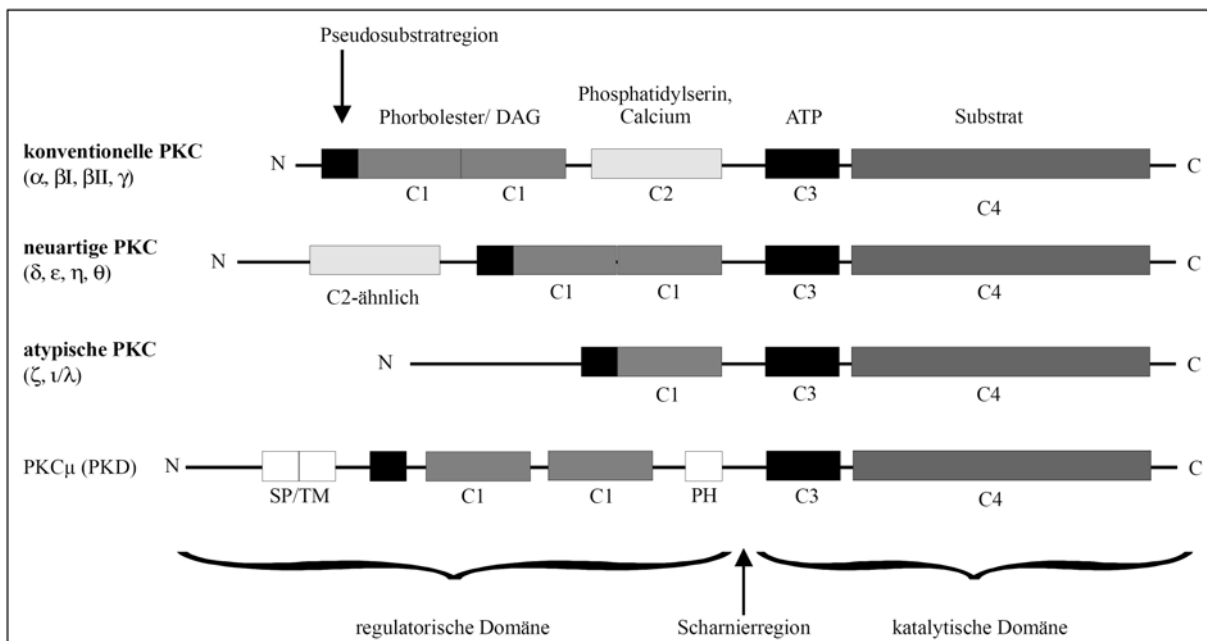


Abb. 5: Schematische Darstellung der Mitglieder der PKC-Familie [nach Newton, 1998 und Parker, 2003]. Die konventionellen PKCs (cPKCs) benötigen Phosphatidylserin, Diacylglycerol (DAG) und Kalzium zu ihrer Aktivierung. Die neuartigen PKCs (nPKCs) sind kalziumunabhängig und werden ebenfalls durch DAG oder Phorbol ester in Gegenwart von Phosphatidylserin aktiviert. Die atypischen PKCs (aPKCs) benötigen zur Aktivierung nur Phosphatidylserin und sind nicht durch Phorbol ester aktivierbar. DAG steht als Abkürzung für Diacylglycerol, PH für Pleckstrin Homologie, SP für Signalpeptid und TM für Transmembran.

Bei der Identifizierung der Beteiligung der PKC an Signalwegen nutzt man deren Eigenschaft einer Aktivierbarkeit durch Phorbol ester. Bereits Anfang der 80er Jahre entdeckte man, dass die PKC Phorbol ester binden, welche mit Diacylglycerol (DAG) um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren [Castagna, 1982]. Wie bereits ausgeführt, werden konventionelle PKC (cPKC) *in vivo* durch DAG aktiviert. *In vitro* imitieren Phorbol ester, darunter Phorbol 12,13-Dibutyrat (PDBu) und Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA), diesen Effekt [Hockberger, 1989; Broad, 1999; Hori, 1999; Murphy, 1999]. Ein weiteres Hilfsmittel zur Charakterisierung stellen kommerziell erhältliche PKC-Inhibitoren wie Gö7874 und Bisindolylmaleimid I (BIM I) dar. Letzterer ist ein spezifischer Inhibitor, der zur Inhibition der klassischen PKC-Isoformen befähigt ist [Gekeler, 1996].

Unter Verwendung der genannten Aktivatoren und Inhibitoren der PKC konnten zahlreiche durch diese Proteinkinasen vermittelte Signalwege ermittelt werden. Unter anderem vermag die PKC die Raf-Kinase, einen Effektor der Signalübertragung der Ras-Proteine, über eine Phosphorylierung zu aktivieren [Krauss, 2003]. Dadurch erfolgt die Aktivierung der MAPK-Kaskade, die im folgenden näher beschrieben wird.

MAPK-Kaskade. Die Aktivierung der Signalübermittlungswege der MAPK (mitogen-activated protein kinase) erfolgt über regulatorische GTPasen. Diese Mitglieder der Ras-Superfamilie (z.B. H-Ras, Rac1) sind zentrale Schaltstationen, die Signale empfangen, modulieren und weitergeben. Die signalübertragende Funktion der Ras-Proteine wird durch GTPase aktivierende Proteine (GAP), Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und Inhibitoren der Guaninnukleotid-Dissoziation (GDI) reguliert. Im GTP-gebundenen Zustand besitzen die Ras-Proteine die Fähigkeit zur Aktivierung der MAPK-Kaskade [Krauss, 2003]. Eine Besonderheit aller MAPK-Signalwege ist, dass sie immer aus einer Serie von drei linear hintereinander geschalteten Proteinkinasen bestehen, die sich nacheinander aktivieren: eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert eine dualspezifische MAPK-Kinase (MAPKK/MEK) und diese phosphoryliert und aktiviert schließlich die jeweilige MAPK. MAP-Kinasen werden hierbei sowohl an Tyrosin- als auch an Serin-/Threonin-Resten phosphoryliert, lösen sich von dem jeweiligen MEK-Protein und können sich nun im Zellkern anreichern, wo sie wiederum über Protein-Phosphorylierung nukleäre Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und dadurch die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen regulieren. Sobald die MAP-Kinasen dephosphoryliert und damit inaktiviert werden, verteilen sie sich zurück ins Zytosol und stehen für weitere Aktivierungszyklen zur Verfügung. Die Signalübertragung durch sequentiell hintereinandergeschaltete Proteinkinasen ist ein sehr flexibles und leistungsfähiges Prinzip, mit dem Signale amplifiziert, diversifiziert und reguliert werden können. Die Natur benutzt den Mitogen-aktivierten Proteinkinase Signaltransduktionsweg in unterschiedlichen Permutationen, um so eine Vielzahl von Aufgaben zu bewältigen. Die MAPK der Mammalia bestehen nach heutigem Kenntnisstand aus mindestens drei Subfamilien: die ERK (**e**xtracellular signal-regulated **k**inases)-Familie, die JNK/SAPK (**J**un **N**-terminal **k**inases/ **s**tress-activated **p**rotein **k**inases) und die p38 MAPK-Familie [Krauss, 2003; Matsumoto, 2004]. (Eine schematische Übersicht zu den MAPK-Permutationen ist aus Abb. A1 S. 57 ersichtlich. Auf eine Darstellung an dieser Stelle wurde zugunsten der Interpretierbarkeit im Anhang gezeigter Ergebnisse verzichtet).

Der ERK-Weg übt eine Kontrollfunktion in Prozessen wie Proliferation, Transformation und Differenzierung aus. Genau wie die JNK/SAPKs werden die p38 MAP Kinasen hauptsächlich durch Stress und proinflammatorische Zytokine aktiviert [Kyriakis, 2001]. Bisher wurden 4 Isoformen der p38 (α , β , γ , δ) mit unterschiedlicher Gewebeverteilung identifiziert [Avitzour, 2007]. Es gilt als sicher, dass die MKK3 und MKK6 recht spezifisch die p38 aktivieren.

Stromabwärts der p38 MAP Kinase sind als Effektoren verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. MAX, CREB) und Kinasen bereits identifiziert worden. So entdeckten zwei Arbeitsgruppen gleichzeitig und unabhängig voneinander die MAPKAP Kinase 2 [Freshney, 1994; Rouse, 1994].

Von der p38-MAPK ist beispielsweise die Produktion der Zytokine IL-1 β und TNF α abhängig, die bei Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) und Osteoporose von Bedeutung sind. Neueste Untersuchungen zur RA zeigten, dass ein Ausschalten der stromabwärts von p38 gelegenen MAPKAP Kinase 2 das Auslösen der kollageninduzierten Arthritis (CIA) im Tiermodell verhindert [Hegen, 2006]. Studien zur Charakterisierung des Signalweges bei der Osteoklastengnese erbrachten, dass die bei diesem Prozess erhöhte Expression von Cathepsin K mit der Aktivierung des p38-Weges korreliert [Matsumoto, 2004].

Somit bleibt festzuhalten, dass aus einer detaillierten Analyse der Signaltransduktionswege sich Möglichkeiten einer therapeutischen Intervention ergeben könnten. Auf dem "OARSI World Congress on Osteoarthritis" im Dezember 2006 in Prag wurden neue therapeutische Strategien und die Relevanz proteolytischer Enzyme bei der Osteoarthrose diskutiert [OsteoArthritis and Cartilage (2006) 14, Supplement 2, die Referenzen in diesem Abschnitt beziehen sich alle auf dieses Literaturzitat].

Die Gruppe um Jean-Pierre Pelletier [S9-S10] berichtete über zwei mögliche therapeutische Ansätze bei der Osteoarthrose. Zum einen konnte durch die orale Gabe von ERK1/2-Inhibitoren im Tiermodell die Progression der OA signifikant reduziert werden. Zum anderen steht die Inhibition von Transkriptionsfaktoren zur Bindung an die DNA im Fokus des Interesses (Inhibition der Cytokine durch Inhibition von NF- κ B, Inhibition der MMP-Synthese durch Inhibition von AP-1).

Die Gruppe um R.F. Loeser Jr. [S11] zeigte, dass Fibronektion-Fragmente die MMP-13 Expression in Chondrozyten über den α 5 β 1-Integrin-Rezeptor und eine nachgeschaltete Aktivierung der MAPK-Kaskade stimulieren.

Von besonderem Interesse sind die vorgestellten Arbeiten der Gruppe um P. Garnero [S56-S57]. Sie inkubierten Knorpelstanzen mit Protease-Inhibitoren und analysierten anschließend die Fragmentation des Kollagens Typ II (Helix-II, CTX-II). Mit ihren Untersuchungen konnten sie zeigen, dass sowohl Cysteinproteasen als auch MMPs an der Fragmentierung von Kollagen Typ II beteiligt sind.

Diese aktuellen Arbeiten belegen zum einen die Notwendigkeit der Aufklärung der Signaltransduktionswege in Chondrozyten. Zum anderen unterstreichen sie die Relevanz der Cysteinproteasen bei der Fragmentierung von Typ II Kollagen, der Hauptmatrixkomponente im Knorpel. Denn trotz einer stark erhöhten Bereitstellung von Kollagenabbaufragmenten bei der OA ist deren Wirkung auf die Expression der Cysteinproteasen und die Auswirkungen auf die intrazelluläre Signalweiterleitung bislang nur sehr wenig erforscht. Aber lokale Signaltransduktionstherapien stellen möglicherweise eine vielversprechende Perspektive für die Behandlung chronischer Krankheiten, wie der OA, dar. Deshalb ist genaues Verständnis dieser Vorgänge die Voraussetzung, um die Möglichkeiten einer Intervention im Hinblick auf ein mögliches Therapiekonzept prüfen zu können. In der vorliegenden Dissertation habe ich deshalb den Einfluss von Kollagenabbaufragmenten des Typ II Kollagens auf die Expression der Cathepsine B, H, K und L in Chondrozyten systematisch untersucht.

Die Arbeiten enthalten die Resultate meiner Untersuchungen zur Entwicklung eines Cathepsin-Assays zur quantitativen Bestimmung der Aktivität der Cathepsine B, H, K und L in vitalen Zellen:

Rüttger A, Mollenhauer J, Löser R, Gütschow M, Wiederanders B (2006) Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. *Veröffentlicht in der Zeitschrift „BioTechniques“* 41(4):469-73.

Rüttger A, Wiederanders B (2007) Microplate assay for cahepsin detection in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. *Zur Publikation angenommen bei „Current Protocols in Protein Science“*.

In diesen Arbeiten wurden die methodischen Voraussetzungen geschaffen, um die Bedeutung der Cathepsine bei der OA aufklären zu können. Basierend auf diesen Untersuchungen ist es uns in der folgenden Arbeit gelungen, die bisher unbekannten Wirkmechanismen der Kollagenabbaufragmente auf die Expression der Cathepsine B, H, K und L in Chondrozyten aufzudecken und die allgemein akzeptierte Bindung des N-Telopeptides des Typ II Kollagens an den chondrozytenspezifischen Kollagenrezeptor Annexin V um wichtige Aspekte der intrazellulären Signalweiterleitung zu erweitern:

Rüttger A, Mollenhauer J, Wiederanders B (2007) The role of cathepsins in osteoarthritis: collagen fragments up-regulate cathepsin expression and activity in normal and osteoarthritic chondrocytes by utilizing PKC-dependent signalling. *Zur Publikation eingereicht bei der Zeitschrift „Arthritis and Rheumatism“*.

Besonders von klinischem Interesse ist die nachstehende Arbeit. Darin wird der Fall einer Patientin mit erheblicher Schmerzsymptomatik und einer vordergründigen Retropatellararthrose ohne wesentliche Knorpeldegradation geschildert, der verdeutlicht, dass die Cysteinproteasen nicht die alleinigen Ziele einer therapeutischen Intervention bei der OA sein können:

Müller C, Wiederanders B, Fuhrmann R, Venbrocks RA, **Rüttger A** (2007) Intraartikulärer Schmerz bei Gonarthrose: Ein Fallbericht über eine stark erhöhte Expression der Cathepsine in Chondrozyten. *Zur Publikation eingereicht bei der „Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete“*.

2 Übersicht zu den Manuskripten

Manuskript 1: Rüttger et al. (2006)

Rüttger A, Mollenhauer J, Löser R, Gütschow M, Wiederanders B (2006) Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. *Veröffentlicht in der Zeitschrift „BioTechniques“ 41(4):469-73.*

Inhalt:

Diese Arbeit beschreibt einen Mikrotiterplatten-Assay (Cathepsin-Assay) zur selektiven und quantitativen Bestimmung der Aktivität der Cathepsine B, H, K und L in vitalen, adhärent wachsenden Zellen. Die Spezifität der Methode wurde durch die Verwendung von verschiedenen selektiven 4-Methoxy- β -Naphthylamid-Derivaten und Peptidyl-Inhibitoren erreicht. Die Validierung des Cathepsin-Assays erfolgte mit Cathepsin-*knockout*-Makrophagen.

Eigenanteil:

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Pflege von HEK 293-Zellen, Präparation und Pflege von primären Chondrozyten und Maus- <i>knockout</i> -Makrophagen	100%
Biochemie I	Entwicklung des Cathepsin-Assays, Western Blot-Analyse der Cathepsine	100%
Biochemie II	Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Cathepsine B, H, K und L	0%
Chemie	Synthese des Cathepsin K Inhibitors Z-LG- $\psi\{C\equiv N\}$	0%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	95%
	Anfertigung des Manuskripts	50%

Manuskript 2: Rüttger und Wiederanders (2007)

Rüttger A, Wiederanders B (2007) Microplate assay for cathepsin detection in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. *Zur Publikation angenommen in "Current Protocols in Protein Science"*.

Inhalt:

In diesem Buchkapitel ist die Durchführung des Cathepsin-Assays, zur quantitativen Bestimmung der Aktivitäten der Cathepsine B, H, K und L, detailliert beschrieben. Es enthält neben der präzisen Versuchsanleitung alle weiterführenden Informationen bezüglich der benötigten Reagenzien und Geräte. Somit wird der Leser in die Lage versetzt, diese Methode selbständig durchzuführen.

Eigenanteil:

Nach der Veröffentlichung der Publikation unserer Methode in der Zeitschrift „BioTechniques“ wurden wir vom Herausgeber der „Current Protocols in Protein Science“ eingeladen den Cathepsin-Assay darin näher zu erläutern. Aufgrund dieser Tatsache umfasst der hier aufgeführte Eigenanteil nur den Gliederungspunkt Präsentation.

	Tätigkeit	Eigenanteil
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	95%
	Anfertigung des Manuskripts	50%

Manuskript 3: Rüttger et al. (2007)

Rüttger A, Mollenhauer J, Wiederanders B (2007) The role of cathepsins in osteoarthritis: collagen fragments up-regulate cathepsin expression and activity in normal and osteoarthritic chondrocytes by utilizing PKC-dependent signalling. *Zur Publikation eingereicht bei der Zeitschrift "Arthritis and Rheumatism"*.

Inhalt:

Diese Studie zeigt die Bedeutung der Cathepsine bei der chronisch verlaufenden degenerativen Erkrankung der Gelenke, der Osteoarthrose. Die bei diesem Prozess frei werdenden Fragmente des Typ II Kollagens, v.a. das N-Telopeptid (Ntelo), wirken als Stimulatoren einer erhöhten Expression der Cathepsine in Chondrozyten. Untersuchungen zur Ntelo-vermittelten Signaltransduktion postulieren eine Beteiligung der Proteinkinase C und der p38 MAPK.

Eigenanteil:

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Präparation und Pflege von primären Chondrozyten boviner und humaner Herkunft, Stimulationsexperimente	100%
Biochemie I	Durchführung des Cathepsin-Assays, Analyse der Signaltransduktion (Western Blots)	100%
Biochemie II	Präparation der nativen Kollagenfragmente	0%
Molekularbiologie	Quantitative Real-Time PCR, PCR-Arrays	100%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	95%
	Anfertigung des Manuskripts	60%

Manuskript 4: Müller et al. (2007)

Müller C, Wiederanders B, Fuhrmann R, Venbrocks RA, Rüttger A (2007) Intraartikulärer Schmerz bei Gonarthrose: Ein Fallbericht über eine stark erhöhte Expression der Cathepsine in Chondrozyten. *Zur Publikation eingereicht bei der „Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete“.*

Inhalt:

In diesem klinischen Fallbeispiel wird eine 69-jährige Patientin vorgestellt, der eine Knie-Totalendoprothese eingesetzt wurde. Isolierte Chondrozyten aus dem Knorpelresektat dieser Patientin zeigten eine im Vergleich zum gesamten Patientenkollektiv signifikant erhöhte Expression der Cathepsin-mRNA und der entsprechenden Enzymaktivitäten. Eine retrospektiv durchgeführte Analyse der Patientendaten ergab, dass die Patientin zwar unter einer Retropatellararthrose litt, ansonsten jedoch keine besonders auffälligen Knorpel- bzw. Knochendegradationszeichen am befallenen Gelenk aufwies.

Eigenanteil:

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Präparation und Pflege von primären Chondrozyten humaner Herkunft	100%
Biochemie I	Durchführung des Cathepsin-Assays	100%
Molekularbiologie	Quantitative Real-Time PCR	0%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	70%
	Anfertigung des Manuskripts	50%

3 Manuskripte

3.1 Manuskript 1

Rüttger A, Mollenhauer J, Löser R, Gütschow M, Wiederanders B (2006) Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. *Veröffentlicht in der Zeitschrift „BioTechniques“ 41(4):469-73.*

Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide

Anke Rüttger^{1,4}, Jürgen Mollenhauer^{1,2}, Reik Löser³, Michael Gütschow³, and Bernd Wiederanders⁴

¹University of Jena, Orthopedical Research Center, Eisenberg, Germany, ²Rush University Medical Center, Chicago, IL, USA, ³University of Bonn, Pharmaceutical Institute Poppelsdorf, Germany, and ⁴University of Jena, Klinikum, Jena, Germany

BioTechniques 41:469–473 (October 2006)
doi 10.2144/000112259

A method is described allowing the selective determination of four cathepsins (B, H, K, and L) in live cells. Adherently growing cells are incubated with partially selective substrates for each cathepsin (peptidic derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamine) in microtiter plates together with nitrosalicylaldehyde. Using an appropriate reader, accumulating fluorescent products may be detected continuously or by end point measurement. Selectivity is achieved by running parallel assays containing inhibitors that are partially selective for each of the cathepsins (in case of cathepsin H, the nonlysosomal aminopeptidases are inhibited by bestatin). Individual cathepsin activities can then be calculated by the difference between the uninhibited and the inhibited assay. The method was validated by measurements in cells isolated from cathepsin B^{-/-}, K^{-/-}, and L^{-/-} mice. This strategy suggests that the combination of two partially selective reaction partners, substrate and inhibitor, can yield selective cathepsin assays.

INTRODUCTION

In order to understand the contribution of cysteine proteinases in pathophysiological processes involving tissue damage such as chronic inflammation or malignancies, it is essential to study the actual enzyme activity in live cells at the posttranslational level. Activity determinations of cell or tissue homogenates do not mirror the situation in intact cells because the destruction of cellular architecture causes (i) mixing of the contents of different compartments, in particular the peptidases with their endogenous inhibitors and (ii) alterations in pH. Therefore, numerous approaches have been developed to monitor peptidase activities in live cells (1–5). A limitation of those techniques is the need for cell fixation. Here, we address this limitation by providing a microplate assay for quantitative fluorometric determination of cathepsin B, H, K, and L activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamine without fixation of cells, perforation of membranes by detergents, or artificial activation of enzyme

activities by cysteine or dithiothreitol. In this assay, the diffusible product 4-methoxy- β -naphthylamine is trapped inside the cell by coupling with 5-nitrosalicylaldehyde (NSA) yielding a yellow fluorescent crystalline product. Although 4-methoxy- β -naphthylamides were established for the intracellular analysis of protease activities more than two decades ago (6) and

derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamine in combination with a coupling reagent have already been used for determination of cathepsin activities, the assays were not performed in live cells (6–8).

The basis of vital activity determination of cathepsins in this report is a continuous monitoring of the development of a fluorescent product as introduced by Van Noorden et al. (5) and as it was later refined by Spiess et al. (4). The optional precipitation of liberated 4-methoxy- β -naphthylamine by addition of NSA to the incubation media prevents the diffusion of the reaction product but does not influence the intensity of fluorescence. If desired, the precipitated substrate can then be located by fluorescence microscopy (4).

MATERIALS AND METHODS

Materials

The substrates Z-Arg-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide (Z-RR-4-M β NA), Z-Phe-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide (Z-FR-4-M β NA), Z-Gly-Pro-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide (Z-GPR-4-M β NA), H-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide (H-R-4-M β NA), and the inhibitors L-*trans*-epoxysuccinyl-Ile-Pro-OMe propylamide (CA-074Me), Z-Phe-Phe-diazomethylketone (Z-FF-CHN₂), L-*trans*-epoxysuccinyl-Leu-3-methylbutylamide ethyl ester (E-64d), and bestatin were all purchased from

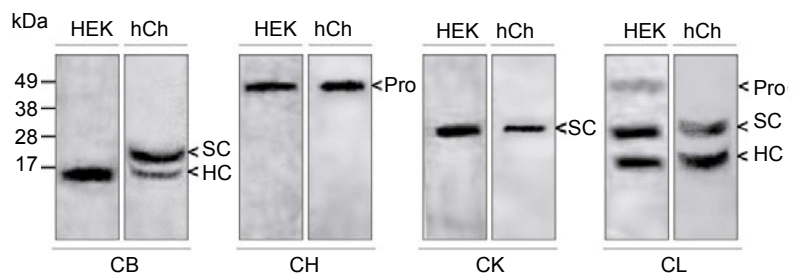


Figure 1. Immunoblots of cathepsins B, H, K, and L (CB, CH, CK, and CL, respectively) in cell lysates. Analysis was performed with cell lysates of human chondrocytes (hCh) and HEK 293 (HEK) cells. Ten micrograms (chondrocytes) and 20 μ g (HEK cells) protein, respectively, were separated under reducing conditions in 4%–12% NuPAGE Bis-Tris gradient gels in MES buffer according to the manufacturer's instructions, blotted onto nitrocellulose membranes, reacted with polyclonal rabbit antibodies to individual human cathepsins, and finally developed by enzymatic detection with a peroxidase-labeled monoclonal antibody against rabbit immunoglobulin G (IgG) by chemiluminescent dye reaction according to manufacturer's protocols. The molecular weight standards, in kDa, are indicated at the left margin. SC, single chain form; HC, heavy chain form; Pro, proenzyme.

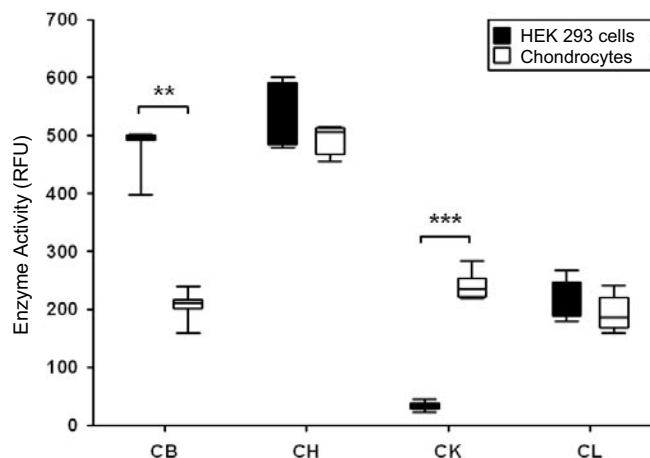


Figure 2. Determination of cathepsins B, H, K, and L (CB, CH, CK, and CL, respectively) activities in HEK 293 cells and human chondrocytes. Cells were incubated with the substrates or substrate/inhibitor mixtures as indicated in the protocol. Fluorescence was measured after 2 h incubation, and the individual cathepsin activities were calculated according to the protocol. Comparative quantification of intracellular CB, CH, CK, and CL activities in HEK 293 cells (black bars) and human chondrocytes (empty bars) is given in artificial relative fluorescence units (RFU). Significant differences of enzyme levels in the cell populations are indicated by asterisks (** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

BACHEM (Bubendorf, Switzerland). NSA was purchased from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). The inhibitor benzyloxycarbonyl-leucyl-glycine nitrile (Z-Leu-Gly-ψ{C≡N}) was synthesized as previously described (9).

Cell Culture

Cells were cultured with phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany). Peritoneal macrophages from C57BL/6

wild-type (WT), cathepsin B^{-/-} (CB^{-/-}) (10), cathepsin K^{-/-} (CK^{-/-}) (11), and cathepsin L^{-/-} (CL^{-/-}) (12) mice were isolated according to Brune et al. (13) and subsequently cultured for 24 h in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS; Gibco™, Invitrogen, Karlsruhe, Germany). The permanent HEK 293 cell line was purchased from ATCC (CRL-1573; Manassas, VA, USA) and routinely cultured at low density in DMEM supplemented with 10% FCS. Chondrocytes were extracted from joint cartilage. Human

material was taken from patients operated for knee endoprotheses (confirmation #1772-04/06, according to the university's ethical guidelines), and fresh bovine material came directly from the slaughterhouse. Chondrocytes were isolated by sequential pronase/collagenase extraction and cultured in DMEM supplemented with 5% FCS.

Cathepsin Activity Assay

For determination of enzyme activity, adherently growing cells (10⁵ cells/well) were seeded into black-walled, clear-bottom 96-well plates (Optilux™; BD Biosciences, Heidelberg, Germany). After 24 h incubation with DMEM/10% FCS, the medium was changed into serum-free and phenol red-free DMEM (100 μL) containing NSA (final concentration 10 μM). The cells were then incubated for 2 h at 37°C with the respective substrate, either alone or with inhibitor (see Table 1). All reagents were directly added to the medium. The following incubation solutions were used (the final concentrations are indicated, S means the assay contains only the substrate, SI means the assay contains substrate and inhibitor). For CB: (S) 1 mM Z-RR-4MβNA; (SI) 1 mM Z-RR-4MβNA plus 1 μM CA-074Me. For CH: (SI) 1 mM H-R-4MβNA plus 1 μM bestatin. For CK: (S) 1 mM Z-GPR-4MβNA; (SI) 1 mM Z-GPR-4MβNA plus 1 μM Z-LG-ψ{C≡N}.

Table 1. Kinetic Constants for Human Cathepsins B, H, L, and K

Enzyme	K _m of Substrate (4-MβNA-derivatives)				K _i of Inhibitor		
	Z-RR-	Z-FR-	Z-GPR-	H-R-	Z-FF-CHN ₂	CA-074 Me	Z-LG-ψ{C≡N}
CB	50 μM ^a	30 μM ^a	n.d.	n.d.	350 ^b	2.24 nM ^c	56 μM
CH	n.d.	n.d.	n.d.	97 μM ^d	n.d.	420 mM ^c	n.d.
CL	40 μM ^e	0.8 μM ^e	81 μM ^f	n.d.	140,000 ^b	172 mM ^c	0.75 μM
CK	25 μM ^e	7.4 μM ^e	32 μM ^f	n.d.	0.1 μM ^g	n.d.	0.03 μM

n.d., no reliable data are available; CB, cathepsin B; CH, cathepsin H; CK, cathepsin K; and CL, cathepsin L.
^aTaken from Reference 7.
^bk_{2app} (M⁻¹s⁻¹) taken from Reference 18.
^cIC₅₀ (half maximal inhibitory concentration), taken from Reference 19.
^dN-naphthylamide substrate, taken from Reference 8. NH₂-terminal protected substrates are poorly hydrolyzed by CH, the K_m for Z-R-p-nitroanilide was 637 μM (8).
^eAMC (amino-methyl-cuomaride) substrates, k_{cat}/K_m was for CL with Z-FR-AMC 1 446 118 M⁻¹s⁻¹ and with Z-RR-AMC 1 750 M⁻¹s⁻¹; for CK with Z-FR-AMC 98 648 M⁻¹s⁻¹ and with Z-RR-AMC 100 M⁻¹s⁻¹, respectively (18).
^fAMC substrates, the k_{cat}/K_m was for CL 135 M⁻¹s⁻¹, for CK 118 750 M⁻¹s⁻¹, respectively (19).
^gNinety percent inhibition at this concentration, taken from Reference 18.
The numbers shall only illustrate the differences between the affinities of the cathepsins to the given substrates and inhibitors. The different incubation conditions are not considered.

For CL: (S) 0.1 mM Z-FR-4M β NA; (SI) 0.1 mM Z-FR-4M β NA plus 1 μ M Z-FF-CHN₂. After 2 h, the cells were covered with 100 μ L phosphate-buffered saline (PBS) at 37°C, and the microtiter plates were recorded with the Fluor-STM MultiImager and qualified using the Quantity One[®] 4.2.1 Software (both from Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). The generated fluorescent product was determined at least in duplicates with excitation and emission wavelength of 488 and 520–530 nm (fluorescein setting), respectively. All measurements were accompanied by a negative control, which included all components of the assay except the substrates (autofluorescence). These autofluorescence values have to be subtracted prior calculation of the activity. The enzyme activities were calculated in the following manner: CB = CB(S) - CB(SI); CH = CH(SI); CK = CK(S) - CK(SI); CL = CL(S) - CL(SI). After another washing step with PBS at 37°C, the cells may be covered with, for example, ProLong[®] Antifade kit (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for microscopic observation.

Electrophoresis and Immunoblotting

Cell lysates were isolated with the RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in accordance with the instructions of the manual. Protein content was determined using the Bradford reagent (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions in MES buffer using 4%–12% NuPAGE[®] Bis-Tris gradient gels (Invitrogen). After protein transfer onto nitrocellulose membranes (Invitrogen) by electroblotting, membranes were blocked with 1% soya proteins (Alpro Soja, Düsseldorf, Germany) in PBS for 1 h and probed overnight with one of the following polyclonal antibodies from Santa Cruz Biotechnology: goat anti-human cathepsin B (S-12), goat anti-human cathepsin H (N-18), goat anti-human cathepsin K (C-16), and

goat anti-human cathepsin L (C-18) antibody, respectively, on separate blots each. Secondary antibody was rabbit anti-goat immunoglobulin G (IgG) conjugated to peroxidase (Santa Cruz Biotechnology). Detection was performed by enzyme-linked chemiluminescence (Pierce SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate; Perbio Science, Bonn, Germany).

Statistical Analysis

All data were expressed as means \pm standard errors. Statistical analyses were performed with statistical software, SPSS 9.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) using the Student's *t*-test. Values of * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Most peptidic protease substrates are only partially specific for one enzyme. One strategy to counter this problem has been described by Bogoy and coworkers, who introduced fluorescently quenched activity-based probes resulting in enhanced specificity (14). Alternatively, the introduction of selective inhibitors may considerably improve the reliability of the activity measurement of the enzyme of interest. Unfortunately, the presently available inhibitors are also not absolutely selective (see Table 1), thus compromising the specificity of the reactions. However, the combination of two partial selective factors—substrate and inhibitor—may enhance the overall specificity of the observed enzyme reaction. Based on this premise, we tested a combined substrate/inhibitor strategy to measure the activities of cathepsins B, H, K, and L.

In the first step, we documented the presence of cathepsins B, H, K, and L in human embryonic kidney cells (HEK 293 cells) and human chondrocytes (hCh) by immunoblotting (Figure 1). To analyze the levels of cathepsins, cell lysates were separated by NuPAGE Bis-Tris gels under reducing conditions and transferred to nitrocellulose for subsequent incubation with polyclonal

antibodies directed against human cathepsins B, H, K, and L, respectively.

We then used our substrate/inhibitor strategy to identify cathepsin B, H, K, and L activities in a comparative and quantitative manner in both HEK 293 cells and primary human chondrocytes (Figure 2). Cathepsin K appears to be elevated in chondrocytes, an observation also made by other researchers (15,16). The obvious difference between the low activity of cathepsin K in HEK cells (Figure 2) and the presence of the enzyme protein shown in the immunoblot of Figure 1 may be explained by the presence of high levels of endogenous inhibitors in the latter cells. This underlines again the importance of enzyme activity determinations in live cells, which sometimes deviate remarkably from the protein content of a given enzyme.

In order to confirm the validity of our assay, we analyzed the cathepsin activities in macrophages isolated from C57BL/6 mice deficient in either cathepsins B (10), cathepsin K (11), or cathepsin L (12) and from wild-type mice, respectively. Peritoneal macrophages were isolated according to Brune et al. (13) and subsequently cultured for 24 h in DMEM containing 10% FCS. As can be seen from Figure 3, no cathepsin B, K, and L activities were detectable in the respective cathepsin deficient macrophages. Cathepsin H deficient mice are not available. We inhibited the cysteine peptidase activities by addition of E-64d (final concentration in culture medium was 100 μ M). E-64d is a membrane-permeable ester derivative of E-64c, an inhibitor of lysosomal cysteine proteases including cathepsin H (17). All activities, including that of cathepsin H, were inhibited by approximately 80%. We take this as an indirect proof that the hydrolysis of H-R-4M β NA was catalyzed by cathepsin H, the only lysosomal thiol-dependent aminopeptidase.

In these experiments, we found that preincubation of the cells with inhibitors instead of simultaneous application of substrate and inhibitor did not change the results (data not shown). This suggests that both inhibitors and substrates reach the site of reaction (i.e., the lysosome) within

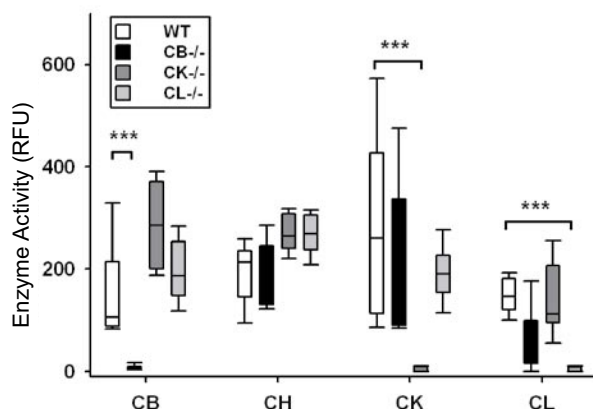


Figure 3. Cathepsin activity assay—validation with knockout mice macrophages. Cells were incubated with the substrates or substrate/inhibitor mixtures as indicated in the protocol. Fluorescence was measured after 2 h incubation, and the individual cathepsin activities were calculated according to the protocol. To confirm the reliability and the selectivity of the method, the absence of cathepsin B, K, and L (CB, CK, and CL, respectively) activities in macrophages isolated from CB^{-/-} C57BL/6 mice (black bars), from CK^{-/-} C57BL/6 mice (dark gray bars) and CL^{-/-} C57BL/6 mice (light gray bars) in comparison to macrophages isolated from wild-type (WT) C57BL/6 mice (white bars) is shown. Activities are given in artificial relative fluorescence units (RFU). Significant differences of enzyme levels in the cell populations are indicated by asterisks (***) ($P \leq 0.001$).

the cells at similar rates, even though cells were not fixed. No activators such as cysteine or dithiothreitol were applied. In addition, accumulation of the fluorescent products may also be observed by fluorescence microscopy (see Supplementary Figure S1 available online at www.BioTechniques.com).

In summary, the microtiter assay shown here allows (i) the characterization of at least four different intracellular cathepsin activities in live cells without fixation of cells and without permeabilization of membranes by detergents; (ii) a marked reduction of 5-nitrosalicylaldehyde concentration (100-fold) compared with other reports (4,5); (iii) a rapid measurement of enzyme activities in the multiwell format; and (iv) the microscopic localization of intracellular cathepsin activities after quantification.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Thomas Reinheckel, Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, for providing us the cathepsin B and cathepsin L knockout mice. We are also

grateful to Paul Saffig, Institut für Biochemie, Christian-Albrecht-Universität Kiel, Germany for providing us the cathepsin K knockout mice. This study was financially supported by EU-subcontract QLK6-CT-2000-00487, chondral and osteous tissue engineering (spare parts), DFG Mo 980/1-2 and Sch 593/1-1, and IZKF, Klinikum Jena.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Assfalg-Machleidt, I., G. Rothe, S. Klingel, R. Banati, W.F. Mangel, G. Valet, and W. Machleidt. 1992. Membrane permeable fluorogenic rhodamine substrates for selective determination of cathepsin L. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 373:433-440.
- Boonacker, E. and C.J. Van Noorden. 2001. Enzyme cytochemical techniques for metabolic mapping in living cells, with special reference to proteolysis. *J. Histochem. Cytochem.* 49:1473-1486.
- Rothe, G., S. Klingel, I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt, C. Zirkelbach, R.B. Banati, W.F. Mangel, and G. Valet. 1992. Flow cytometric analysis of protease activities in vital cells. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 373:547-554.
- Spiess, E., A. Bruning, S. Gack, B. Ulbricht, H. Spring, G. Trefz, and W. Ebert. 1994. Cathepsin B activity in human lung tumor cell lines: ultrastructural localization, pH sensitivity, and inhibitor status at the cellular level. *J. Histochem. Cytochem.* 42:917-929.
- Van Noorden, C.J.F., I.M.C. Vogels, V. Everts, and W. Beertsen. 1987. Localization of cathepsin-B activity in fibroblasts and chondrocytes by continuous monitoring of the formation of a final fluorescent reaction-product using 5-nitrosalicylaldehyde. *Histochem. J.* 19:483-487.
- Dolbeare, F.A. and R.E. Smith. 1977. Flow cytometric measurement of peptidases with use of 5-nitrosalicylaldehyde and 4-methoxy-beta-naphthylamine derivatives. *Clin. Chem.* 23:1485-1491.
- Simon, J. and M.J. Duffy. 1986. Characterization of a cathepsin B-like enzyme from breast-cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 14:460.
- Schwartz, W.N. and A.J. Barrett. 1980. Human cathepsin H. *Biochem. J.* 191:487-497.
- Loser, R., K. Schilling, E. Dimmig, and M. Gutschow. 2005. Interaction of papain-like cysteine proteases with dipeptide-derived nitriles. *J. Med. Chem.* 48:7688-7707.
- Reinheckel, T., J. Deussing, W. Roth, and C. Peters. 2001. Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol. Chem.* 382:735-741.
- Saffig, P., E. Hunziker, O. Wehmeyer, S. Jones, A. Boyde, W. Rommerskirch, J.D. Moritz, P. Schu, et al. 1998. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13453-13458.
- Roth, W., J. Deussing, V.A. Botchkarev, M. Pauly-Evers, P. Saffig, A. Hafner, P. Schmidt, W. Schmahl, et al. 2000. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J.* 14:2075-2086.
- Brune, K., U. Aehringhaus, and B.A. Peskar. 1984. Pharmacological control of leukotriene and prostaglandin production from mouse peritoneal macrophages. *Agents Actions* 14:729-734.
- Blum, G., S.R. Mullins, K. Keren, M. Fonovic, C. Jedeszko, M.J. Rice, B.F. Sloane, and M. Bogyo. 2005. Dynamic imaging of protease activity with fluorescently quenched activity-based probes. *Nat. Chem. Biol.* 1:203-209.
- Morko, J.P., M. Soderstrom, A.M. Saamanen, H.J. Salminen, and E.I. Vuorio. 2004. Up regulation of cathepsin K expression in articular chondrocytes in a transgenic mouse model for osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 63:649-655.
- Hou, W.S., W. Li, G. Keyszer, E. Weber, R. Levy, M.J. Klein, E.M. Gravalles, S.R. Goldring, et al. 2002. Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum.* 46:663-674.
- Kirschke, H., A.J. Barrett, and N.D. Rawlings. 1995. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* 2:1581-1643.
- Bromme, D., K. Okamoto, B.B. Wang, and S. Biroc. 1996. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 271:2126-2132.
- Lecaille, F., Y. Choe, W. Brandt, Z. Li, C.S. Craik, and D. Bromme. 2002. Selective inhibition of the collagenolytic activity of human cathepsin K by altering its S2 subsite specificity. *Biochemistry* 41:8447-8454.

Received 19 April 2006; accepted 17 July 2006.

Address correspondence to Bernd Wiederanders, Institute of Biochemistry I, Klinikum, Friedrich-Schiller-University Jena, Nonnenplan 2, D-07743 Jena, Germany. e-mail: bwie@mti.uni-jena.de

To purchase reprints of this article, contact: Reprints@BioTechniques.com

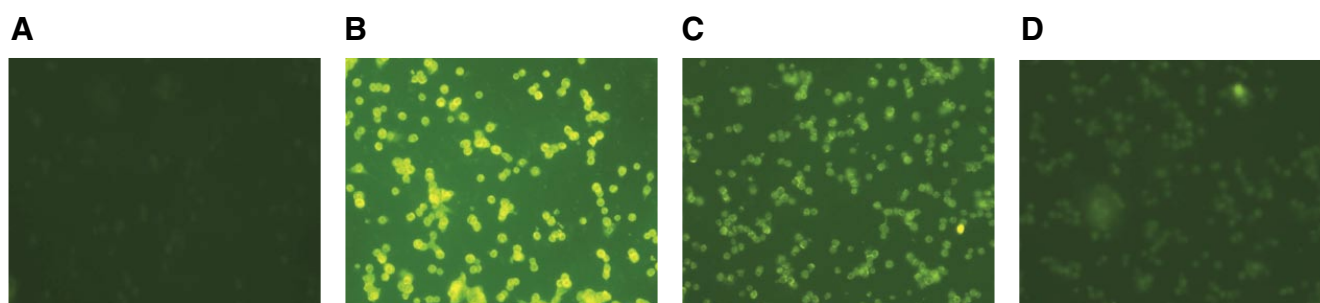
SUPPLEMENTARY MATERIAL FOR:

Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide

Anke Rüttger^{1,4}, Jürgen Mollenhauer^{1,2}, Reik Löser³, Michael Gütschow³, and Bernd Wiederanders⁴

¹University of Jena, Eisenberg, Germany, ²Rush University Medical Center, Chicago, IL, USA, ³University of Bonn, Bonn, Germany, and ⁴University of Jena, Jena, Germany

BioTechniques 41:469-473 (October 2006)



Supplementary Figure S1. Microscopic documentation of Z-Phe-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide (Z-FR-4M β NA) hydrolysis by cathepsin L in primary bovine chondrocytes. Microscopy was performed using an Axiovert 200 M fluorescence microscope (ApothomeTM; Carl Zeiss AG, Jena, Germany) at 440 and 470 nm filter settings for excitation and emission, respectively. Cells were incubated for 2 h with 10 μ M 5-nitrosalicylaldehyde (NSA) (A) alone (first negative control), (B) NSA and 100 μ M Z-FR-4M β NA (S), (C) NSA and 100 μ M Z-FR-4M β NA and 1 μ M Z-Phe-Phe-diazomethylketone (Z-FF-CHN₂) (SI), and (D) NSA and 1 μ M Z-FF-CHN₂ (I, second negative control).

3.2 Manuskript 2

Current Protocols in Protein Science

Chapter 21

MICROPLATE ASSAY FOR CATHEPSIN DETECTION IN VIABLE CELLS USING DERIVATIVES OF 4-METHOXY- β -NAPHTHYLAMIDE

Anke Ruettger^{1,2}, Bernd Wiederanders^{1*}

¹ Institute of Biochemistry I, Universitätsklinikum, Friedrich-Schiller-Universität Jena

² Orthopedical Research Unit Eisenberg, Universitätsklinikum, Friedrich-Schiller-Universität Jena

* corresponding author:

Institute of Biochemistry I,

Universitätsklinikum, Friedrich-Schiller-Universität, Nonnenplan 2, D-07743 Jena, Germany

phone: ++49-3641-938611

fax: ++49-3641-938612

e-mail: bwie@mti.uni-jena.de

2 figures

0 tables

0 multi-line equations

key terms: in vivo cathepsin assay, live cells, selectivity, microplate assay

Abstract: The procedure describes the direct and selective detection of the four cathepsins B, H, K and L in adherently growing cells. Cells are incubated with substrates that are peptidic derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamine partially selective for each cathepsin together with nitrosalicyl aldehyde. The protease reaction is performed in microtiter plates and the fluorescent hydrolysis products detected using a plate reader. The selectivity of detection is enhanced by parallel assays containing inhibitors that are also partially selective for each of the cathepsins. Individual cathepsin activities can then be calculated by the difference between the uninhibited and the inhibited assays. Detection of cathepsin H activity differs from the other assays in that other non-lysosomal aminopeptidases are inhibited by bestatin. The most common application of these assays is to compare directly cells treated with different substances, e.g., pharmaceuticals.

Lysosomal cysteine proteinases participate in a wide range of physiological and pathological processes. Cathepsin B plays an essential role in diseases, e.g. rheumatoid arthritis, pancreatitis, liver injury, and it is an important factor for spreading of malignant tumours. Cathepsin H may have a potential relevance in early atherogenesis. Cathepsin K is predominantly expressed in osteoclasts and it is involved in bone resorption. Deficiency of cathepsin K causes the hereditary disease pycnodysostosis, a rare disorder with an osteopetrotic phenotype. It is a critical protease for collagen degradation in inflamed joints.

Cathepsin L is critically involved in periodic hair follicle renewal and plays a role in MHC class II antigen presentation in thymus epithelia. The implication of those cathepsins in disease processes makes them ideal targets in order to selectively inhibit enhanced proteolysis (Rawlings, 2006).

Therefore, this unit describes a procedure that allows the detection of cathepsin B, H, K and L activities in cell cultures, i.e., in their physiological environment. The cellular compartments remain intact, and the regulation of the endogenous activity by pH, redox state, various natural effectors, and other parameters, is not disturbed. In principle, the method is also applicable for other cellular proteases, provided a selective substrate is available. The described method cannot be used for the detection of secreted extracellular proteases, such as matrix metalloproteases. Most proteases accept not only proteins, but also low molecular weight peptidic derivatives as substrates. Therefore, the hydrolysis of peptidic substrates is a useful method for the detection of protease activities. Generally, a quenched chromogenic or fluorogenic group is liberated upon hydrolysis of the peptidic substrate. In the protocols described in this unit, the 4-methoxy- β -naphthylamide group is used. The increase of signal intensity upon substrate hydrolysis can then be registered by fluorometry and photometry, respectively. Continuous detection, as well as endpoint measurements, are possible in single reaction cuvettes, but numerous instruments are commercially available that allow detection of product formation in microtiter plates, as well.

Most low-molecular weight peptidic substrates are small and lipophilic enough to penetrate membrane systems (e.g., the plasma membrane, vesicular membranes) and, therefore, can simply be added to the cell culture medium where they are then taken up by the cells. The method described in this unit employs adherently growing cells, but may be easily adapted for cell suspensions.

CAUTION: The liberated 4-methoxy- β -naphthylamine is cancerous. Avoid direct contact with skin, eyes or mouth. Wear gloves!

Basic Protocol

MICROPLATE ASSAY FOR CATHEPSIN DETECTION IN VIABLE CELLS USING DERIVATIVES OF 4-METHOXY- β -NAPHTHYLAMIDE

Activity measurements using cell or tissue homogenates do not mirror the situation in intact cells because the destruction of cellular architecture mixes the contents of different compartments, in particular the peptidases with their endogenous inhibitors and substrates. The pH of various compartments is also changed. Therefore, most cell-free methods described for the determination of intracellular cathepsin activities are of limited use. In contrast to previous reports (Van Noorden, 1987; Spiess, 1994) the cathepsin activity assay described here allows the detection of at least four different intracellular cathepsin activities in live cells without fixation of cells and without permeabilization of membranes by detergents. As previous reports mentioned (Van Noorden, 1987; Dolbeare 1977), 5-nitrosalicylaldehyde (NSA) forms a Schiff base with the proteolytically released 4-methoxy- β -naphthylamine to produce a yellow fluorescent final reaction product. Figure 1 is a schematic of the cathepsin-assay, and the main steps of the procedure are highlighted in Figure 2. Figure 3 highlights some representative results comparing differentially treated cells.

Materials:

Cells

The permanent HEK 293 cell line could be used as a control and was purchased from ATCC (CRL-1573).

Dimethylsulfoxide

Substrate solutions (see recipe):

Substrates:

- Z-Arg-Arg-4-methyl- β -naphthylamide (...4-M β NA); M_r : 619.72; K_m : 50 μ M
- H-Arg-4-M β NA; M_r : 329.4; K_m : 97 μ M
- Z-Gly-Pro-Arg-4-M β NA; M_r : 617.71; K_m : 32 μ M
- Z-Phe-Arg-4-M β NA; M_r : 647.17; K_m : 0.8 μ M

The substrates were all purchased from BACHEM (Bubendorf, Switzerland).

The specificity for each substrate was previously mentioned in Ruettinger et al. (2006).

Inhibitor solutions (see recipe):

Inhibitors:

- L-*trans*-epoxysuccinyl-(propylamide)-Ile-Pro-methyl ester (CA-074Me), M_r : 397.47; K_i : 2.24 nM
- Bestatin; M_r : 308.38
- Z-Leu-Gly nitrile; M_r : 303.36; K_i : 0.03 nM (*Source of supply: Prof. Dr. Michael Gütschow, Pharmaceutical Institute Poppelsdorf, University of Bonn, guetschow@uni-bonn.de; (Loser, 2005)*)
- Z-Phe-Phe- diazomethan (...CHN₂); M_r : 470.53; K_i : 0.1 μ M
- L-*trans*-epoxysuccinyl-Leu-3-methylbutylamide-ethyl ester (E-64 d) ; M_r : 342.43

The inhibitors were all purchased from BACHEM (Bubendorf, Switzerland).

The specificity for the inhibitors was previously mentioned in Ruettinger et al. (2006).

Abbreviations used: Z- , carbobenzoxy-; 4M β NA, 4-methoxy- β -naphthylamide.

Serum-free, phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; D2902-10x1L; Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

5-nitrosalicylaldehyde solution (M_r : 167.12; Fluka; see recipe)

Phosphate-buffered saline (see recipe)

Antifade Kit (ProLong®, Molecular Probes invitrogen detection technologies, P7481)

96-well Black/Clear Assay Plates (Optilux™, BD Biosciences)

The authors have tested many types of plates and found these to be best suited for this assay.

Microtiter plate reader with fluorescence detection (e.g., Multi-S Multi Imager from BIO-RAD).

NOTE: Perform all incubations in a humidified 37°C, 5% CO₂ incubator.

1. Place 10⁵ adherently growing cells per well in black-walled, clear-bottom 96-well microtiter plates.

2. Remove the serum-containing culture medium and use a multichannel pipettor to add 100 µl 10 µM 5-nitrosalicylaldehyde working solution per well to the cell monolayer.
3. Add 1 µl of the respective substrate solution (S; final concentration: 1 mM), either alone or with 1 µl inhibitor solution (SI; final concentration: 1 µM) and incubate the cells with S and with SI, respectively, for 2 hr at 37°C. All reagents are directly added to the medium. Mix well and incubate for 2 hr.

Perform all assays at least in duplicate.

Include a negative control lacking substrate (incubation only with 10 µM 5-nitrosalicylaldehyde solution).

Verify the specificity of the reaction by incubation in presence of 100 µM E-64d (membrane-permeable cysteine protease inhibitor; see Materials). The extent of inhibition represents the hydrolysis mediated by cysteine proteases.

4. Add 100 µl prewarmed (37°C) phosphate-buffered saline to each well prior to quantitative determination.
5. Read the microtiter plate with fluorescence detection using 488 nm excitation and 520-30 nm emission wavelengths. This is the fluorescein setting in most instruments. Average the value of replicate determinations and subtract the averaged value of autofluorescence (from the control assay with 5-nitrosalicylaldehyde alone) prior calculation of activity.
6. Calculate cathepsin activity:
 - a. $CB = CB(S) - CB(SI)$;
 - b. $CH = CH(SI)$;
 - c. $CK = CK(S) - CK(SI)$;
 - d. $CL = CL(S) - CL(SI)$.

Abbreviations: CB, cathepsin B; CH, cathepsin H; CK, cathepsin K; CL, cathepsin L; S, assay with substrate; SI, assay with substrate plus inhibitor.

7. Optional step: Microscopic observation/documentation of fluorescent cells is possible, however, the incubation of cells in slide chambers is preferred for this purpose. This optional step enables the reader only to localize and visualize the accumulation of the fluorescent products.

In order to avoid fading of the fluorescent reaction product it is absolutely necessary to use an Antifade Kit (see Materials).

Reagents and Solutions

Substrate solutions

NOTE: Stir the solutions at room temperature until the substrate is fully dissolved. Aliquot the solutions and store up to 1 year at -20°C protected from light.

CB(S): Prepare a 100 mM working solution (final concentration: 1 mM) by dissolving 6.2 mg Z-Arg-Arg-4-methoxy-β-naphthylamide in 100 µl dimethylsulfoxide.

CH(S): Prepare a 100 mM working solution (final concentration: 1 mM) by dissolving 3.3 mg H-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide in 100 μ l dimethylsulfoxide.

CK(S): Prepare a 100 mM working solution (final concentration: 1 mM) by dissolving 6.2 mg Z-Gly-Pro-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide in 100 μ l dimethylsulfoxide.

CL(S): Prepare a 100 mM working solution (final concentration: 1 mM) by dissolving 6.5 mg Z-Phe-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide in 100 μ l dimethylsulfoxide.

Inhibitor Solutions

CB(I): Prepare a 10 mM stock solution by dissolving 3.9 mg CA-074Me in 1 ml dimethylsulfoxide. Aliquot the solution and store up to 1 year at -20°C protected from light. Immediately before use, prepare a fresh 100 μ M working solution by diluting 1 μ l stock solution in 99 μ l serum-free, phenol red-free medium.

CH(I): Prepare a 10 mM stock solution by dissolving 3.3 mg bestatin in 1 ml dimethylsulfoxide. Aliquot the solution and store up to 1 year at -20°C protected from light. Immediately before use, prepare a fresh 100 μ M working solution by diluting 1 μ l stock solution in 99 μ l serum-free, phenol red-free medium.

CK(I): Prepare a 10 mM stock solution by dissolving 3.0 mg Z-Leu-Gly nitrile in 1 ml dimethylsulfoxide. Aliquot the solution and store for up to several years at room temperature. Immediately before use, prepare a fresh 100 μ M working solution by diluting 1 μ l stock solution in 99 μ l serum-free, phenol red-free medium.

CL(I): Prepare a 10 mM stock solution by dissolving 4.7 mg Z-Phe-Phe-diazomethylketone (Z-FF-CHN₂) in 1 ml dimethylsulfoxide. Aliquot the solution and store up to 1 year at -20°C protected from light. Immediately before use, prepare a fresh 100 μ M working solution by diluting 1 μ l stock solution in 99 μ l serum-free, phenol red-free medium.

5-nitrosalicylaldehyde solution

Prepare a 10 mM stock solution by dissolving 1.7 mg 5-nitrosalicylaldehyde in 1 ml dimethylsulfoxide. Aliquot the solution and store up to 1 year at -20°C protected from light. Immediately before use, prepare a fresh 10 μ M working solution by diluting 10 μ l stock solution (NSA) in 9.99 ml prewarmed (37°C) serum-free, phenol red-free medium.

Phosphate-buffered saline (PBS)

Dissolve 8 g NaCl (137 mM), 1.19 g Na₂HPO₄ (10.1 mM), 0.2 g KCl (2.7 mM), 0.2 g KH₂PO₄ (1.5 mM) in ~900 ml water. Adjust pH to 7.4 at room temperature with HCl and add water to a final volume of 1000 ml. Store up to 1 month at room temperature.

Commentary

Background Information

4-methoxy- β -naphthylamine liberated from peptidic 4-methoxy- β -naphthylamide derivatives forms a fluorescent Schiff base which can be used for the detection of peptidase and arylamidase activities in intact cells. The method was originally used for flow cytometric analyses (Dolbeare, 1977; Dolbeare, 1979) and was later refined to localize hydrolytic compartments (Van Noorden, 1987; Spiess, 1994). A similar and alternative method has been described that employs fluorogenic rhodamine-based substrates for the detection of intracellular peptidase activities (Assfalg-Machleidt, 1992; Rothe, 1992).

In the protocol presented in this unit, cathepsin peptidase activities are detected in their natural cellular environment. This is an important advantage over the measurement of peptidase activities in cell homogenates, where the membranes of cellular compartments are disrupted, redox factors, endogenous substrates and inhibitors are mixed and the pH are changed according to the user's conditions.

The selectivity of peptidase activity detection is a general problem. Despite different kinetic parameters, most peptidic substrates are hydrolyzed by numerous and varied peptidases. One strategy to address this problem was recently described in which fluorescence-quenched activity-based probes were used to increase the specificity of the reaction (Blum, 2005). The approach described in this unit to enhance the selectivity of the detection method is to combine two partially selective factors: the substrate and an inhibitor. Inhibitors can be added to selectively reduce the activity of specific cathepsin subtypes if more than one subtype hydrolyzes the substrate. The difference between the total reaction activity and the inhibited reaction activity then represents the activity of the enzyme of interest. The validity of the method has been established by measuring the activity of the cathepsins B, L and K in cells isolated from the respective gene knock-out mice and essentially no activity was detected in the cathepsin knock-out cell lines (Ruettinger, 2006).

The procedure for the detection of cathepsin H activity differs from that used for the other cathepsin subtypes. Cathepsin H is the only lysosomal amino peptidase, and it is a cysteine protease (Schwartz, 1980). To selectively determine cathepsin H activity it is necessary to inhibit other cellular amino peptidase activities that utilize different catalytic mechanisms. They can be inhibited by bestatin, a general inhibitor of amino peptidases (Umezawa, 1976). Therefore, the bestatin-inhibited activity represents the cathepsin H activity. This procedure has also been verified by measuring the activity in cells isolated from cathepsin H \neg mice obtained from Christoph Peters' lab (unpublished data, address: christoph.peters@mol-med.uni-freiburg.de).

The central advantages of the procedure described in the present protocol are twofold: it is highly selective at least for the four cathepsins B, H, K and L, and it is adapted to the microtiter plate format, thus allowing the analysis of 96 samples simultaneously.

Critical Parameters

The concentration of substrates and inhibitors in the reaction compartment cannot be standardized as a reaction in a test tube because each substance diffuses through the membrane at different rates and to different extents. Therefore, it is recommended to apply the method for direct comparisons, e.g., of cells treated with pharmaceuticals vs. untreated cells.

The authors have found that pre-incubation of the cells with inhibitor 1 hr before the addition of the substrate versus simultaneous addition of substrate and inhibitor yields identical results.

Troubleshooting

The quality of 5-nitrosalicylaldehyde may be a critical factor. If strong inhibition of the reaction or rapid product precipitation is observed, repeat experiments using 5-nitrosalicylaldehyde obtained from a different supplier.

Anticipated Results

The best results can be expected for direct comparing different cell populations. We applied the method to study human and bovine chondrocytes and human embryonic kidney cells (Ruettinger, 2006), the authors of the original papers used fibroblasts of different origin (Dolbeare, 1979). Figure 3 highlights some representative results comparing differentially treated cells (e.g., stimulation of bovine chondrocytes with collagen fragments or inhibition of human OA chondrocytes with the cysteine protease inhibitor E-64d).

Time Considerations

Preparation of stock solutions:	60 min
Preparation of microtiter plates:	30 min
Incubation:	120 min
Calculations:	30 min

Figures

Figure 1

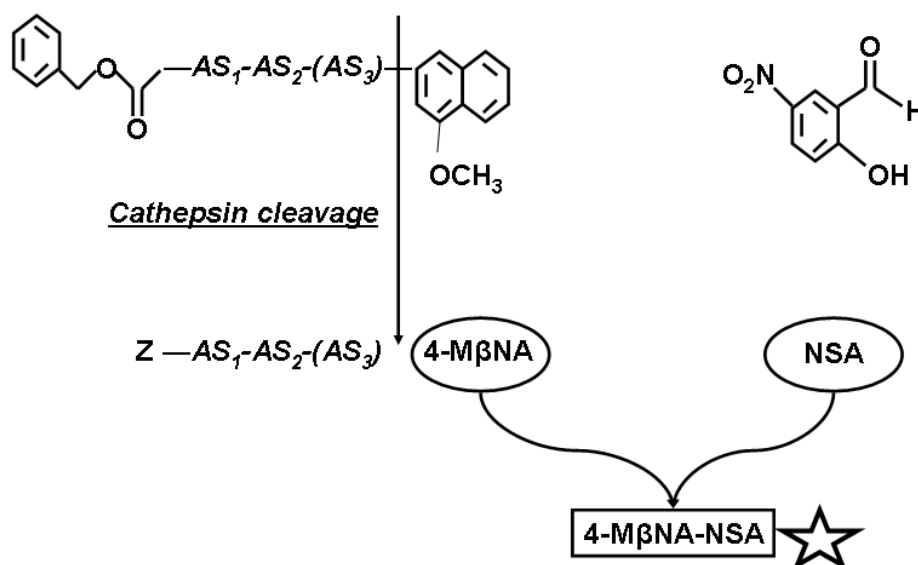


Figure 2

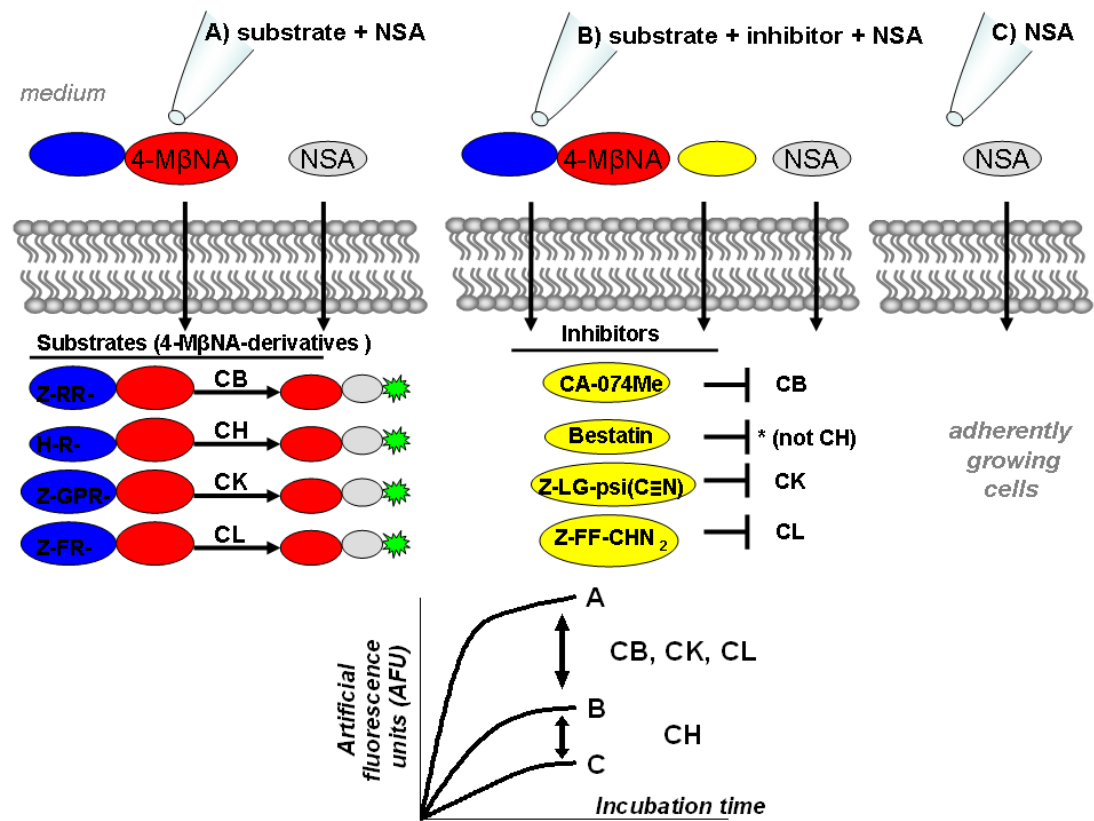


Figure 3

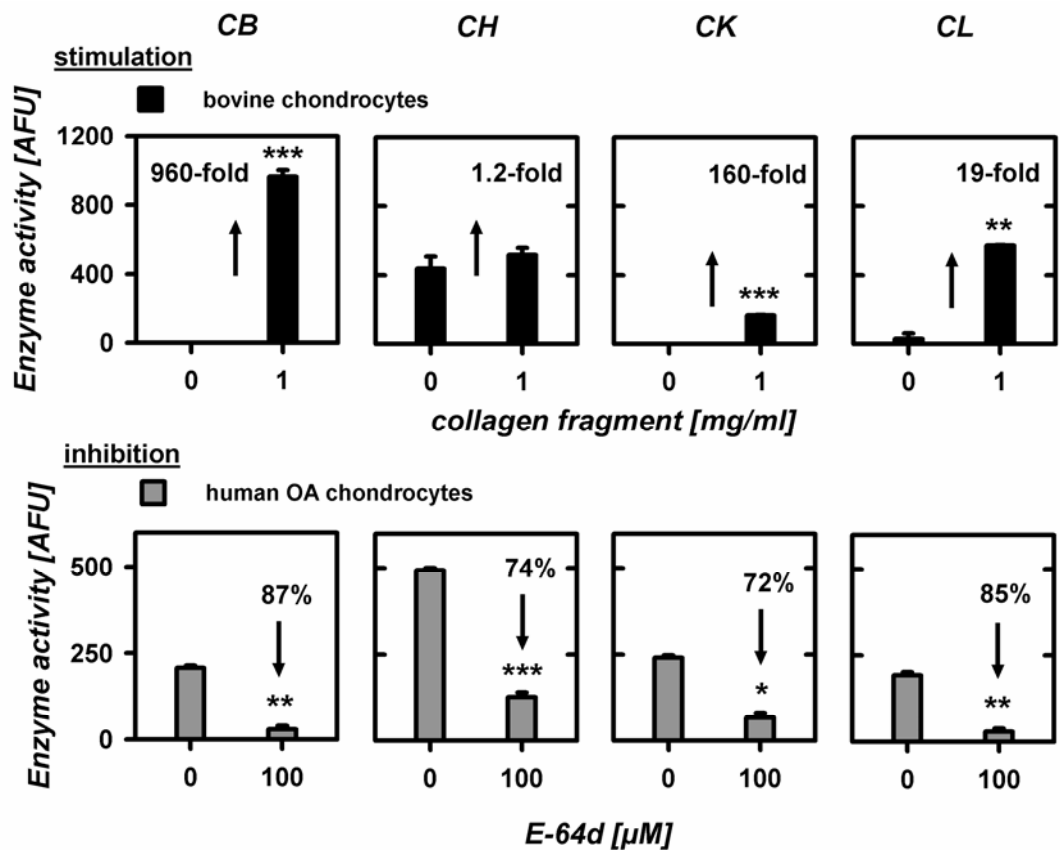


Figure Legends:

Figure 1:

Schematic diagram of hydrolysis of peptidic 4-methoxy- β -naphthylamide derivatives. 5-nitrosalicylaldehyde couples via Schiff base to the proteolytically released 4-methoxy- β -naphthylamine to produce a yellow fluorescent reaction product (4-M β NA-NSA).

Abbreviations: AS, amino acid; Z-, carbobenzoxy-; 4M β NA, 4-methoxy- β -naphthylamide; NSA, 5-nitrosalicylaldehyde.

Figure 2:

The main handling steps of the cathepsin-assay.

Figure 3: Representative results comparing differentially treated cells (stimulation of bovine chondrocytes with collagen fragments and inhibition of human OA chondrocytes with E-64d).

Literature Cited

1. **Rawlings, N.D., F.R. Morton and A.J. Barrett.** 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34:D270-272.
2. **Van Noorden, C.J., I.M. Vogels, V. Everts and W. Beertsen.** 1987. Localization of cathepsin B activity in fibroblasts and chondrocytes by continuous monitoring of the formation of a final fluorescent reaction product using 5-nitrosalicylaldehyde. *Histochem J* 19:483-487.
3. **Spiess, E., A. Bruning, S. Gack, B. Ulbricht, H. Spring, G. Trefz and W. Ebert.** 1994. Cathepsin B activity in human lung tumor cell lines: ultrastructural localization, pH sensitivity, and inhibitor status at the cellular level. *J Histochem Cytochem* 42:917-929.
4. **Dolbeare, F.A. and R.E. Smith.** 1977. Flow cytometric measurement of peptidases with use of 5-nitrosalicylaldehyde and 4-methoxy-beta-naphthylamine derivatives. *Clin Chem* 23:1485-1491.
5. **Dolbeare, F. and M. Vanderlaan.** 1979. A fluorescent assay of proteinases in cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem* 27:1493-1495.
6. **Assfalg-Machleidt, I., G. Rothe, S. Klingel, R. Banati, W.F. Mangel, G. Valet and W. Machleidt.** 1992. Membrane permeable fluorogenic rhodamine substrates for selective determination of cathepsin L. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373:433-440.
7. **Rothe, G., S. Klingel, I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt, C. Zirkelbach, R.B. Banati, W.F. Mangel and G. Valet.** 1992. Flow cytometric analysis of protease activities in vital cells. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373:547-554.
8. **Blum, G., S.R. Mullins, K. Keren, M. Fonovic, C. Jedeszko, M.J. Rice, B.F. Sloane and M. Bogyo.** 2005. Dynamic imaging of protease activity with fluorescently quenched activity-based probes. *Nat Chem Biol* 1:203-209.
9. **Ruettger, A., J. Mollenhauer, R. Loeser, M. Guetschow and B. Wiederanders.** 2006. Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. *Biotechniques* 41:469-472.
10. **Schwartz, W.N. and A.J. Barrett.** 1980. Human cathepsin H. *Biochem J* 191:487-497.
11. **Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Suda, M. Hamada and T. Takeuchi.** 1976. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* 29:97-99.

3.3 Manuskript 3

THE ROLE OF CATHEPSINS IN OSTEOARTHRITIS: COLLAGEN FRAGMENTS UP-REGULATE CATHEPSIN EXPRESSION AND ACTIVITY IN NORMAL AND OSTEOARTHRITIC CHONDROCYTES BY UTILIZING PROTEIN KINASE C - DEPENDENT SIGNALLING

Anke Rüttger^{a, c}, Jürgen Mollenhauer, PhD^b, and Bernd Wiederanders, MD, PhD^{*c}

^a Research Unit at Waldkrankenhaus "Rudolf Elle" Eisenberg, Chair of Orthopaedics, Friedrich-Schiller-Universität of Jena, Germany

^b Department of Biochemistry, Rush University Medical Center, Chicago, IL, and Natural and Medical Sciences Institute NMI, Reutlingen, Eberhard-Karls-Universität Tuebingen, Germany.

^c Institute of Biochemistry I, Klinikum, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany

* to whom correspondence and reprint requests should be addressed

Institute of Biochemistry I, Klinikum, Friedrich – Schiller - University Jena
Nonnenplan 2, D-07743 Jena,
Germany

Phone: +49-3641-938611

Fax: +49-3641-938612

E-mail bwie@mti.uni-jena.de

This study was financial supported by: ¹ EU-subcontract QLK6-CT-2000-00487 „Chondral and osteous tissue engineering (spare parts)“; ² DFG Mo 980/1-2 and Sch 593/1-1 and ³ IZKF, Klinikum Jena.

Abstract

Objective: Proteases act in concert to degrade the extracellular matrix. Based on this insight the contribution of cysteine proteases in the degenerative disease – osteoarthritis (OA) - is explored in the present study. The influence of collagen type II derived peptides on the expression and activity of these proteases is studied. **Methods:** Primary cultures of chondrocytes were treated with different collagen fragments. The expression / activity of cysteine proteases was studied on the mRNA, protein and activity levels. The activation of protein kinase C (PKC) was studied in order to elucidate its contribution to the collagen peptide related signal transduction. **Results:** Cathepsin expression of OA chondrocytes was significantly increased in comparison to the controls. Collagen fragments, especially the N-terminal telopeptide of type II collagen (Ntelo) caused a significant up-regulation of cathepsin B, K and L expression and activity in both normal and OA chondrocytes. This dose-dependent effect was at least in part mediated by the activation/phosphorylation of PKC. **Conclusion:** These findings suggest 1) that cathepsins may contribute substantially to cartilage degradation in OA and 2) that collagen degradation products may amplify and preserve the erosive process in OA by stimulating the expression of matrix degrading cysteine proteases via activation of protein kinase C.

Introduction

The participation of proteolytic enzymes in the pathogenesis of osteoarthritis was suggested already 30 years ago (1). The key event in arthritic lesions is the degradation of cartilage matrix proteins, predominantly consisting of collagen type II. Therefore, the regulation of collagenolytic protease activity in resting and in activated chondrocytes has been extensively studied during the past two decades. Matrix metallo proteases (MMPs) and ADAMTSs (A Disintegrin-like And Metalloprotease domain with ThromboSpndin type I motifs) have been reported to be mainly responsible for matrix destruction in degenerative joint diseases (2-6). However, cysteine proteases may also play an essential role in this catabolic process (5-8). Amongst them cathepsin K is the only protease cleaving native triple-helical collagen (9). It is mainly expressed in osteoclasts (10-12) but occurs also in activated chondrocytes (5, 13-15) and in synovial fibroblasts of patients suffering from rheumatoid arthritis (16). Kontinen et al. detected the pH in the immediate surrounding of degraded cartilage areas in osteoarthritic lesions to be between pH 6.2 and 5.5 (15). This milieu is acidic enough for autocatalytic activation of procathesin K released from chondrocytes. In the presence of chondroitin-4-sulfate active cathepsin K may then efficiently attack triple-helical collagen (9). Since osteoarthritis is a chronic disease the question remains for the reason of the persistence of the degradative processes outside of inflammatory episodes - the so-called "chondrocytic chondrolysis" (17). This concept was further evolved implicating matrix autolysis products into the process of constant hyperactivation of chondrocytic matrix degrading enzymes (18-21).

Degradation products of collagen type II are secreted into the urine and into the synovial fluid. Collagen derived peptides are used as diagnostic tools to follow progredient cartilage breakdown (22-26). In this context it is important to note that not only inflammatory reactions but also mechanical injuries may lead to an enhanced release of such peptides (27). About 1 – 3 % of the total collagen dry mass in normal cartilage occurs as partially degraded collagen peptides (21, 28, 29) whereas this percentage is much larger in OA cartilage, namely up to 6 % (28) or even 20 % (29). Those peptides are not only diagnostic markers of cartilage degradation but also initiate a cascade of matrix degrading proteolytic activities (20, 21). Fichter et al. have shown levels of MMPs -2, -3, -9 and -13 mRNA and protein to be elevated after stimulation with collagen degradation products; thus, collagen peptides may contribute to the regulation of matrix turnover (20). Here we show that cysteine proteases may also be involved in this process and may be selectively stimulated in a similar manner by collagen type II derived peptides.

Materials and methods

Materials

The substrates Z-Arg-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide (Z-RR-4-M β NA), Z-Phe-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide (Z-FR-4-M β NA), Z-Gly-Pro-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide (Z-GPR-4-M β NA), H-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide (R-4-M β NA,) and the inhibitors L-trans-epoxysuccinyl-Ile-Pro-OMe propylamide (CA-074Me), Z- Phe-Phe-diazomethylketone (Z-FF-CHN₂) and Bestatin methyl ester were purchased from BACHEM (Bubendorf, Switzerland). 5-nitrosalicyl aldehyde (NSA) was purchased from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). The inhibitor Benzyloxycarbonyl-leucyl-glycine nitrile (Z-Leu-Gly-{CN}) was synthesized as

previously described (30). The native bovine collagen fragments col1 and col2f were prepared as previously described (21). A synthetic 29-mer amino acid peptide (N telo) was used, corresponding to the N-telopeptide of human type II collagen (20). It was purchased from JPT Peptide Technologies (Berlin, Germany). The activator of protein kinase C (PKC) Phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu) was purchased from Biomol (Hamburg, Germany). The pan-PKC inhibitor InSolution™ Bisindolylmaleimide I (GF109203X, Gö 6850) was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany).

Tissue samples

Articular cartilage was harvested from bovine or human knee joints. All human tissue samples were used with the patient's informed consent and institutional approval (University of Jena Medical Faculty Ethics Committee approval # 1772-04/06). Normal human articular cartilage was obtained from 2 donors (47 and 71 years old) and non OA cartilage was obtained from 2 amputation patients (82 and 83 years old) with no history of joint disease (the very old "non OA" patients both suffered from diabetic feet). OA cartilage was obtained from 30 patients (mean age 64 years, range 33-83 years, 14 males and 16 females) undergoing total knee replacement surgery. Human cartilage was collected from tibial and femoral surfaces of the knee joint. Bovine cartilage was collected from the femoral surfaces of the knee joint.

Cell culture

Chondrocytes were extracted from tissue by sequential pronase/collagenase digestion (31). For stimulation experiments, chondrocytes were precultured in DMEM plus 5% fetal calf serum (FCS) for 24 hours in 96-well microtiter plates at a density of 10^5 cells per well. Subsequently, chondrocytes were cultured in DMEM plus 1% FCS in the presence of different collagen fragments (col1, col2f) and of varying concentrations (0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1 mg/ml) of the synthetic 29mer N-telopeptide of type II collagen (Ntelo) for 24 or 72 hours. The culture media were collected and analysed for released procathepsins by immunoblotting, mRNA levels of cathepsins were analysed by real-time PCR, and the enzyme activities were measured by a cathepsin activity assay (32). Briefly, adherent cells (about 10^5 cells per well) were seeded in black-walled, clear-bottom 96-well microtiter plates. The culture medium was replaced by 100 µl serum-free and phenol red-free medium and cells were incubated for 2 hours at 37°C with the following substrate or substrate / inhibitor mixtures: 1mM Z-RR-4MβNA with or without 1µM CA-074Me for cathepsin B; 1 mM H-R-4MβNA with or without 1µM Bestatin for cathepsin H; 1 mM Z-GPR-4MβNA + 1µM Z-LG-ψ (C≡N) for cathepsin K; 0.1mM Z-FR-4MβNA + 1µM Z-FF-CHN₂ for cathepsin L. After 2 hours cells were washed and covered with 100 µl phosphate-buffered saline (37°C). The generated fluorescent product was read using a microplate reader at $\lambda_{488 \text{ nm}}$ excitation and $\lambda_{520 - 530 \text{ nm}}$ emission. Controls were run without substrates. Activity was calculated by subtracting the fluorescence in the presence of inhibitor from the fluorescence in the absence of inhibitor (for cathepsins B, L and K) resulting in "artificial fluorescence units" (AFU). The assay with Bestatin represented the activity of cathepsin H because Bestatin is a general aminopeptidase inhibitor (33).

To assess the effect of extracellular Ca^{2+} on the Ntelo effect chondrocytes were cultured with calcium-free DMEM (US Biological, Swampscott, MA, USA) or the same medium containing 1mM CaCl_2 .

For the experiments with the pan PKC-inhibitor, Bisindolylmaleimide I (BIM I), human OA chondrocytes were preincubated in absence or presence of Bisindolylmaleimide I (final concentration: 240 nM) for 1 hour. Thereafter the cells were stimulated with PDBu (100 ng/ml) or Ntelo (0,5 mg/ml) for different periods of time. The cathepsin activities were measured as described above.

Electrophoresis and immunoblotting

For detection of procathepsins cell culture medium was separated by SDS-PAGE under reducing conditions in MES buffer using 4-12% NuPAGE Bis-Tris gradient gels (Invitrogen, Carlsbad, USA). After protein transfer onto nitrocellulose membranes (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) by electroblotting, membranes were blocked with 1% soy proteins (Alpro Soja, Düsseldorf Germany) in PBS for 1 hour and probed overnight with one of the following polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA): goat anti-human cathepsin B (S-12), goat anti-human cathepsin K (C-16) and goat anti-human cathepsin L (C-18) antibody respectively, on separate blots each. Secondary antibody was rabbit anti-goat IgG conjugated to peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Detection was performed by enzyme-linked chemiluminescence (Pierce SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Perbio Science, Bonn, Germany).

For detection of PKC cell lysates were isolated with the RIPA Lysis Buffer (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) as described in the manual. Protein content was determined using the Bradford reagent (Sigma, Germany). Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE as mentioned above and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA; MERCK, Germany) in TBS-T for 1 hour.

Both phosphorylated and nonphosphorylated PKC levels were detected by monoclonal rabbit anti-human phospho-PKC (pan) antibody (Cell Signaling Technology; Beverly, MA) and monoclonal mouse-anti-PKC (pan: α, β, γ) antibody (Biomol, Hamburg, Germany). Secondary antibody was *rabbit anti-goat* IgG conjugated to peroxidase (Perbio Science, Bonn, Germany). Detection was performed by enzyme-linked chemiluminescence (Pierce SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Perbio Science, Bonn, Germany) or 4-chloronaphthol staining (Sigma, Germany).

Real-time PCR

Total RNA from human chondrocytes was extracted with the TRIzol reagent (Life Technologies) in accordance to the manufacturers manual. One μg total RNA was used for transcription into complementary DNA (cDNA) using OmniScript Reverse Transcriptase Kit (Quiagen), oligo-dT primer (Amersham Pharmacia) and RNase out (Invitrogen). One μL of the cDNA was used as template to specifically amplify cathepsins B, K and L message. Real-time PCR was carried out using a MyiQ Cyclor with the iQ SYBR Green Supermix, as described by the manufacturer (Bio-Rad). Beta-actin mRNA served as an internal control.

The following primers were used (34):

- 5'-acc acg gcc gag cgg gaa atc-3' and 5'-gag ccg ccg atc cac acg gag ta-3' (resulting in a 635-bp fragment for β -actin),-
- 5'-gca gcc tca gcc acc cag at-3' and 5'-cca cca tta cag ccg tcc cca cac-3' (resulting in a 539-bp fragment for cathepsin B), -
- 5'-gtg tgg ttc ctg ttg ggc ttg tag-3' and 5'-tcc ttg gtt tcc cca gtt ttc tcc-3' (resulting in a 514-bp fragment for cathepsin K), -
- 5'-ccg ggg agg gca gtt gag-3' and 5'-cct tga ggc cca gag cag tc-3' (resulting in a 612-bp fragment for cathepsin L).

Statistical analysis

All data were expressed as means \pm standard errors. Statistical analyses were performed with statistical software, SPSS 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) using the student's *t*-test. Values of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ were considered significant.

Results

Comparison of basal cathepsin mRNA expression in normal, non OA and OA chondrocytes

We have measured the expression levels of cathepsins B, H, K and L in chondrocytes isolated from three groups of individuals: humans with healthy knee joints, such without OA history and those suffering from OA. Initially, we were able to confirm that the mRNA expression of cathepsins B, K and L were significant higher in OA chondrocytes than in normal chondrocytes, as reported elsewhere (6, 7, 14) (data not shown).

In addition, we were able to measure significantly elevated levels of intracellular enzyme activities. The presence of cathepsins B, H, K and L in human chondrocytes (hCh) has been recently documented (32). The basis of vital activity staining of cathepsins in this report is the continuous monitoring of the development of a fluorescent product as introduced by van Noorden et al. (35) and as recently optimized in our group (32). As can be seen from Fig. 1A chondrocytes isolated from OA patients show significant higher activities of cathepsins B, K and L than chondrocytes isolated from the two "normal" control knee joints. The cathepsin H activity, however, appears not to be enhanced. The two non OA patients were 82 and 83 years old women whose "normal" state of the knee joints must be questioned because of the diabetes.

Effects of type II collagen fragments on cathepsin expression

We hypothesized that collagen type II degradation products may play a substantial role in maintaining this catabolic process by stimulating the synthesis or / and activation of cathepsins which may partially responsible for the matrix degradation. In order to study our hypothesis we incubated human chondrocyte primary cultures isolated from two OA patients and from a 47 years old woman without signs of OA with collagen fragments (Fig. 1B). The collagen fragments were derived from either complete cartilage collagen matrix (colf) or purified collagen type II (col2f), besides the synthetic peptide mimicking the aminoterminal telopeptide of collagen type II (Ntelo) (20, 36). Incubation of the chondrocytes with collagen

fragments for 72 h led to an increase of cathepsin K and L activity, whereas the activity of cathepsin H remained unchanged. Cathepsin L activity was also slightly enhanced. The effects were more pronounced in the chondrocytes of the healthy donor compared to the OA chondrocytes. The most prominent stimulation was obtained with the N-terminal telopeptide of collagen type II (Ntelo).

The Ntelo effect is dose dependent

Ntelo represents a very defined element, as compared to the fragment mixtures colf and col2f. The concentration range of Ntelo appears to be high but in fact, is not. One mg/ml relates to a total collagen type II concentration of 30 mg/g tissue (calculated from the molar percentage of amino acid residues) whereas cartilage contains approximately 250 mg/g tissue wet weight. Since we observed the highest effect with Ntelo we investigated the role of this peptide on cathepsin expression in more detail. Primary articular chondrocytes from an OA patient were cultured for 3 days in the presence of various concentrations of Ntelo (0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1 mg/ml). Incubation of the chondrocytes with Ntelo resulted in a significant dose dependent enhancement of cathepsin B, K and L mRNA (Fig. 2 A). The most prominent effect was observed for cathepsin K whose mRNA level increased by a factor of 6 after stimulation with 1 mg Ntelo/ml. In order to study whether the effect could be saturated we increased the concentration of Ntelo to 4 mg/ml without observing additional increases (Fig. 2 B). The effect on cathepsin L and B expression was not studied.

We further measured the enzyme activities of the cathepsins B, L, H and K after stimulation by Ntelo. In this case, the stimulation experiment was performed with chondrocytes isolated from a human OA knee and from a bovine knee, respectively, in order to see whether the stimulation could be reached for both types of chondrocytes. Fig. 2 C shows the result. Cathepsin B was stimulated in OA and in normal chondrocytes to the same extent by a dose of 0.8 – 1.0 mg Ntelo/ml. The stimulation of cathepsin K (about 10 - fold at 1 mg Ntelo/ml) was much more pronounced in OA chondrocytes compared to normal chondrocytes whose cathepsin K activity was not detectable without stimulation by Ntelo. The cathepsin L activity was already high in OA chondrocytes compared to normal chondrocytes and was increased about two - fold. However, normal chondrocytes could be stimulated by Ntelo to considerably increase the cathepsin L activity, starting from a very low level. Cathepsin H activity in chondrocytes remained unchanged under the influence of Ntelo.

Collagen degradation in cartilage is an extracellular process. If cathepsins are involved in the matrix degradation of cartilage the enzymes must be secreted and activated. Cathepsins are secreted in the form of their inactive precursors. Therefore, we studied whether cathepsin precursors occurred in the culture medium of chondrocytes. We collected the culture media of the chondrocytes which were stimulated by the various Ntelo concentrations. The media were separated by SDS PAGE and analyzed by immune blots for cathepsin B, L and K precursors. Control medium without and with 1 % FCS did not contain any of the cathepsin precursors (Fig. 3, lanes 1 and 2). Incubation of chondrocytes with low doses (0.4 mg/ml) of Ntelo for 72 h led to a significant secretion of cathepsin K and L precursors, for secretion of procathepsin B 0.6 mg/ml Ntelo was necessary (Fig. 3).

The Ntelo effect is dependent on the presence of extracellular calcium

Ntelo was reported to bind to annexin V, which may function as a plasma membrane Ca^{2+} -channel. After binding of the ligand, this channel allows the influx of extracellular calcium (36, 37). In order to test the hypothesis whether the observed effects were mediated through activation of transmembrane calcium fluxes we cultured the chondrocytes in Ca^{2+} free medium and performed the Ntelo stimulation for 24 h. As shown in Fig. 4, there was no increase of cathepsin K activity in Ca^{2+} free medium after stimulation of chondrocytes by 1 mg/ml Ntelo peptide, a concentration which increased the cathepsin K activity nearly 4 - fold in presence of extracellular Ca^{2+} .

Up-regulation of the cathepsins B, K and L but not cathepsin H is paralleled by phosphorylation of PKC

In order to explore the signal transduction pathway leading to the enhanced synthesis, activation and secretion of the cathepsins under the influence of Ntelo and because of the calcium effect we studied the phosphorylation state of PKC. Incubation of chondrocytes with Ntelo for 60 min led to an increased phosphorylation of PKC comparable to that seen after incubation with the phorbol ester Phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu) a general activator of PKC (see Fig. 5) (38). In order to exclude the possibility that activation of PKC and up-regulation of cathepsin expression are independent processes we performed two experiments using the general PKC inhibitor Bisindolylmaleimide I. First, treatment of chondrocytes with PDBu for 1 hour resulted in a stimulation of the cathepsin B, K and L but not cathepsin H activities in those cells. Prolonged treatment for 2 hours with PDBu further increased the activities of cathepsins B and L, however, not of cathepsin K. After 12 hours incubation with PDBu the activities of the three cathepsins were lower than before the treatment with PDBu started (Fig. 6, left panel). This effect is probably due to the degradation of PKC after longer exposition of cells with phorbol esters (39). Pretreatment of the chondrocytes with the inhibitor Bisindolylmaleimide I reduced the effect of the PDBu treatment on the cathepsin activities significantly (Fig. 6, left panel) suggesting that activation of PKC and the increase of cathepsin activities are not independent processes. It should be mentioned that the effects were not observed for cathepsin H.

In a second experiment chondrocytes were incubated with Ntelo for 1, 2 and 24 hours in presence or in absence of the PKC inhibitor Bisindolylmaleimide I. The up-regulation of cathepsin K activity was already visible after 1 hour, whereas the effect on the cathepsin B and L activities took more time and was highest after 24 hours incubation. Again, the effect was significantly inhibited by Bisindolylmaleimide I (Fig. 6, right panel). This indicates the involvement of PKC activity in the signalling of the Ntelo effect on cathepsin B, K and L expression and activation in cultured human chondrocytes.

Discussion

Osteoarthritis and rheumatoid arthritis are chronic diseases characterized by the loss of collagen type II and of the proteoglycan matrix in various joints resulting in a severe loss of articular function. Although analgetic and antiphlogistic treatments may reduce the symptoms, complete healing of the diseases is still a challenge. The synovial fibroblasts are continuously activated by proinflammatory cytokines thus leading to the chronicity of the

process. In addition, the up-regulation of collagen degrading protease activities by collagen type II degradation products suggests a self maintaining process. Recently, some of us reported MMPs -2, -3, -9 and -13 to be upregulated by the treatment of cultured chondrocytes with collagen type II derived peptides (20). The present report describes for the first time the up-regulation by collagen type II derived peptides of another class of collagen degrading activities, the lysosomal cathepsins B, K and L. Whereas cathepsin B probably does not attack native insoluble collagen, the two other cathepsins, L and K, have been shown to degrade collagen (9, 40). Thus, the chondrocytes may deliver an arsenal of enzymes directed against the tissue whose correct function is their original purpose. Moreover, it is already known that fibronectin fragments also induce proteoglycan and collagen type II degradation and that this pathway may substantially contribute to the maintenance of arthritic processes and finally to the chondrocytic chondrolysis (41-43). Fibronectin fragments induce the release of catabolic cytokines in cartilage explants (44). An IL-1 mediated pathway has been postulated to promote the collagen type II catabolism (42, 45).

Most likely the collagen type II derived peptides as well as the fibronectin fragments cannot directly influence the expression, secretion and activation of the procathepsins and proMMPs even though some fibronectin fragments bind to integrin $\alpha 5 \beta 3$ (46). The knowledge of the signal cascade triggered by these proteolytic fragments is important since therapeutic interventions may eventually interrupt this cascade. Our results suggest the involvement of PKC in the up-regulation of cathepsins B, K and L. However, we observed some differences between the PDBu effect and the Ntelo peptide effect indicating different pathways of activation. The PDBu effect is quick and short lasting; long term treatment of chondrocytes with the phorbol ester reverses the effect (cf. Fig. 6). In contrast, the effect of Ntelo is a slow process, and the effect can still be observed after 24 h treatment (cf. Fig. 6). PDBu is a DAG analogon and activates PKC directly. Ntelo has been reported to bind to Annexin V (36) which acts as a channel for the inward current of extracellular calcium (37). Indeed, the omission of calcium from the cell culture medium abolished the Ntelo effect completely (cf. Fig. 4) confirming this hypothesis. The increase of the intracellular Ca^{2+} concentration also activates PKC, however this path takes more time. The downstream effects are identical and end up among others with the activation of the p38 MAPK (data not shown). This kinase is known to induce the expression of various proteases such as cathepsin K (47, 48) as well as MMP-3, -9 and -13 (49, 50). The increase of the intracellular Ca^{2+} concentration may also lead to an accelerated release of vesicular contents (51-53) and may thus be responsible for the occurrence of procathepsins B, K and L in the culture medium of chondrocytes under the influence of the Ntelo peptides. The release of procathepsins may also be considered as passive process resulting from chondrocyte disruption. Annexin V has been reported to regulate apoptosis in growth plate chondrocytes (54). These authors showed that the interaction of annexin V with $\beta 5$ integrin induced the apoptotic process, but not the activation of PKC by annexin V.

Surprisingly cathepsin H does not follow the regulation of the three other cathepsins. The different chromosomal localization of the various cathepsins (B: 8p22-23.1; K: 1q21; L: 9q21-22) does not necessarily imply that their promoters are also different. However, little is known on the promoters controlling the expression of the cathepsins studied in this report. SP1 and SP3 binding to GC boxes, NF-Y binding to CCAAT motifs have been described, as well as the absence of TATA boxes in the cathepsin L gene (55, 56). The promoter of cathepsin H

also does not contain TATA boxes and CAAT repeats (57) suggesting that both cathepsins, L and H represent housekeeping genes. Similar data are not reported for the cathepsins B and K, however, the existence of various initiation sites for transcription has been reported for cathepsin B in tumor samples (58). The predominant occurrence of cathepsin K in osteoclasts suggests specific expression signalling (11).

Finally, indirect evidence exists that lysosomes are not a uniform class of intracellular vesicles. Already more than 30 years ago Katunuma and Kominami have shown that cathepsin L is localized in perinuclear vesicles of liver cells, whereas cathepsin H was found in vesicles close to the plasma membrane (59). Ulbricht et al. reported the differentiated liberation of cathepsins B and L from tumor cells after treatment with 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (12(S)-HETE), an arachidonic acid metabolite (60). Claus et al. reported the accumulation of cathepsin H in early lysosomes and the trafficking of lysosomal enzymes between the various vesicles (61). Such intracellular diversification might also exist in chondrocytes and explain the observed differential behaviour of cathepsin stimulation, an assumption that still remains to be proven.

References

1. Sapolsky A, Howell D. Proteolytic enzymes in human cartilage: the pathogenesis of osteoarthritis. *Compr Ther* 1976;2(10):33-40.
2. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005;434(7033):644-8.
3. Mort JS, Billington CJ. Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. *Arthritis Res* 2001;3(6):337-41.
4. Hellio Le Graverand MP, Eggerer J, Sciore P, Reno C, Vignon E, Otterness I, et al. Matrix metalloproteinase-13 expression in rabbit knee joint connective tissues: influence of maturation and response to injury. *Matrix Biol* 2000;19(5):431-41.
5. Uusitalo H, Hiltunen A, Soderstrom M, Aro HT, Vuorio E. Expression of cathepsins B, H, K, L, and S and matrix metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. *Calcif Tissue Int* 2000;67(5):382-90.
6. Keyszer G, Redlich A, Haupl T, Zacher J, Sparmann M, Engethum U, et al. Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis Rheum* 1998;41(8):1378-87.
7. Lang A, Horler D, Baici A. The relative importance of cysteine peptidases in osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000;27(8):1970-9.
8. Baici A, Lang A, Horler D, Kissling R, Merlin C. Cathepsin B in osteoarthritis: cytochemical and histochemical analysis of human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* 1995;54(4):289-97.
9. Li Z, Hou WS, Bromme D. Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates. *Biochemistry* 2000;39(3):529-36.
10. Velasco G, Ferrando AA, Puente XS, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in *Escherichia coli*, and expression analysis in human tissues. *J Biol Chem* 1994;269(43):27136-42.

11. Bromme D, Okamoto K, Wang BB, Biroc S. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1996;271(4):2126-32.
12. Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, et al. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* 1996;271(21):12511-6.
13. Rantakokko J, Aro HT, Savontaus M, Vuorio E. Mouse cathepsin K: cDNA cloning and predominant expression of the gene in osteoclasts, and in some hypertrophying chondrocytes during mouse development. *FEBS Lett* 1996;393(2-3):307-13.
14. Morko JP, Soderstrom M, Saamanen AM, Salminen HJ, Vuorio EI. Up regulation of cathepsin K expression in articular chondrocytes in a transgenic mouse model for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63(6):649-55.
15. Kontinen YT, Mandelin J, Li TF, Salo J, Lassus J, Liljestrom M, et al. Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46(4):953-60.
16. Hummel KM, Petrow PK, Franz JK, Muller-Ladner U, Aicher WK, Gay RE, et al. Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *J Rheumatol* 1998;25(10):1887-94.
17. Riede UN, Staubesand J. A unifying concept for the role of matrix vesicles and lysosomes in the formal pathogenesis of diseases of connective tissues and blood vessels. *Beitr Pathol* 1977;160(1):3-37.
18. Homandberg GA, Meyers R, Xie DL. Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture. *J Biol Chem* 1992;267(6):3597-604.
19. Knudson W, Casey B, Nishida Y, Eger W, Kuettner KE, Knudson CB. Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum* 2000;43(5):1165-74.
20. Fichter M, Korner U, Schomburg J, Jennings L, Cole AA, Mollenhauer J. Collagen degradation products modulate matrix metalloproteinase expression in cultured articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2006;24(1):63-70.
21. Jennings L, Wu L, King KB, Hammerle H, Cs-Szabo G, Mollenhauer J. The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes. *Connect Tissue Res* 2001;42(1):71-86.
22. Hein G, Franke S, Muller A, Braunig E, Eidner T, Stein G. The determination of pyridinium crosslinks in urine and serum as a possible marker of cartilage degradation in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1997;16(2):167-72.
23. Downs JT, Lane CL, Nestor NB, McLellan TJ, Kelly MA, Karam GA, et al. Analysis of collagenase-cleavage of type II collagen using a neoepitope ELISA. *J Immunol Methods* 2001;247(1-2):25-34.
24. Christgau S, Garnero P, Fledelius C, Moniz C, Ensigt M, Gineyts E, et al. Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone* 2001;29(3):209-15.
25. Jung M, Christgau S, Lukoschek M, Henriksen D, Richter W. Increased urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology* 2004;71(2):70-6.
26. Bank RA, Krikken M, Beekman B, Stoop R, Maroudas A, Lefeber FP, et al. A simplified measurement of degraded collagen in tissues: application in healthy, fibrillated and osteoarthritic cartilage. *Matrix Biol* 1997;16(5):233-43.

27. Thibault M, Poole AR, Buschmann MD. Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments. *J Orthop Res* 2002;20(6):1265-73.
28. Hollander AP, Heathfield TF, Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C, et al. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin Invest* 1994;93(4):1722-32.
29. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997;99(7):1534-45.
30. Loser R, Schilling K, Dimmig E, Gutschow M. Interaction of papain-like cysteine proteases with dipeptide-derived nitriles. *J Med Chem* 2005;48(24):7688-707.
31. Kuettner KE, Memoli VA, Pauli BU, Wrobel NC, Thonar EJ, Daniel JC. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. *J Cell Biol* 1982;93(3):751-7.
32. Ruettger A, Mollenhauer J, Loeser R, Guetschow M, Wiederanders B. Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. *Biotechniques* 2006;41(4):469-472.
33. Saito M, Takegoshi K, Aoyagi T, Umezawa H, Nagai Y. Stimulatory effect of bestatin, a new specific inhibitor of aminopeptidases, on the blastogenesis of guinea pig lymphocytes. *Cell Immunol* 1978;40(2):247-62.
34. Schuler S, Wenz I, Wiederanders B, Slickers P, Ehrlich R. An alternative method to amplify RNA without loss of signal conservation for expression analysis with a proteinase DNA microarray in the ArrayTube format. *BMC Genomics* 2006;7:144.
35. Van Noorden CJ, Vogels IM, Everts V, Beertsen W. Localization of cathepsin B activity in fibroblasts and chondrocytes by continuous monitoring of the formation of a final fluorescent reaction product using 5-nitrosalicylaldehyde. *Histochem J* 1987;19(9):483-7.
36. Lucic D, Mollenhauer J, Kilpatrick KE, Cole AA. N-telopeptide of type II collagen interacts with annexin V on human chondrocytes. *Connect Tissue Res* 2003;44(5):225-39.
37. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002;82(2):331-71.
38. Soderholm H, Olsson A, Lavenius E, Ronnstrand L, Nanberg E. Activation of Ras, Raf-1 and protein kinase C in differentiating human neuroblastoma cells after treatment with phorbol ester and NGF. *Cell Signal* 2001;13(2):95-104.
39. Peng Z, Grimberg E, Sagi-Eisenberg R. Suppression of Synaptotagmin II restrains phorbol ester-induced downregulation of protein kinase C α by diverting the kinase from a degradative pathway to the recycling endocytic compartment. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 15):3083-92.
40. Maciewicz RA, Etherington DJ. A comparison of four cathepsins (B, L, N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. *Biochem J* 1988;256(2):433-40.
41. Homandberg GA, Hui F, Wen C, Purple C, Bewsey K, Koepp H, et al. Fibronectin-fragment-induced cartilage chondrolysis is associated with release of catabolic cytokines. *Biochem J* 1997;321 (Pt 3):751-7.
42. Yasuda T, Poole AR. A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway. *Arthritis Rheum* 2002;46(1):138-48.
43. Barilla ML, Carsons SE. Fibronectin fragments and their role in inflammatory arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2000;29(4):252-65.
44. Dreier R, Wallace S, Fuchs S, Bruckner P, Grassel S. Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9). *J Cell Sci* 2001;114(Pt 21):3813-22.

45. Cawston TE, Ellis AJ, Humm G, Lean E, Ward D, Curry V. Interleukin-1 and oncostatin M in combination promote the release of collagen fragments from bovine nasal cartilage in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215(1):377-85.
46. Homandberg GA, Costa V, Wen C. Fibronectin fragments active in chondrocytic chondrolysis can be chemically cross-linked to the $\alpha 5$ integrin receptor subunit. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(12):938-49.
47. Troen BR. The regulation of cathepsin K gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:165-72.
48. Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, et al. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem* 2004;279(44):45969-79.
49. Kim HA, Cho ML, Choi HY, Yoon CS, Jhun JY, Oh HJ, et al. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2006;54(7):2152-63.
50. Nguyen J, Gogusev J, Knapnougel P, Bauvois B. Protein tyrosine kinase and p38 MAP kinase pathways are involved in stimulation of matrix metalloproteinase-9 by TNF- α in human monocytes. *Immunol Lett* 2006;106(1):34-41.
51. Stojilkovic SS. Ca^{2+} -regulated exocytosis and SNARE function. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16(3):81-3.
52. Jans R, Sartor M, Jadot M, Poumay Y. Calcium entry into keratinocytes induces exocytosis of lysosomes. *Arch Dermatol Res* 2004;296(1):30-41.
53. Rodriguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW. Lysosomes behave as Ca^{2+} -regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* 1997;137(1):93-104.
54. Wang W, Kirsch T. Annexin V/ $\beta 5$ integrin interaction regulate apoptosis of growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* 2006;281(41):30848 - 30856.
55. Jean D, Guillaume N, Frade R. Characterization of human cathepsin L promoter and identification of binding sites for NF- κ B, Sp1 and Sp3 that are essential for its activity. *Biochem J* 2002;361(Pt 1):173-84.
56. Ishidoh K, Taniguchi S, Kominami E. Egr family member proteins are involved in the activation of the cathepsin L gene in v-src-transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238(2):665-9.
57. Ishidoh K, Kominami E, Katunuma N, Suzuki K. Gene structure of rat cathepsin H. *FEBS Lett* 1989;253(1-2):103-7.
58. Berquin IM, Cao L, Fong D, Sloane BF. Identification of two new exons and multiple transcription start points in the 5'-untranslated region of the human cathepsin-B-encoding gene. *Gene* 1995;159(2):143-9.
59. Katunuma N, Kominami E. Lysosomal thiol cathepsins and their endogenous inhibitors. Distribution and localization. *Prog Clin Biol Res* 1985;180:71-9.
60. Ulbricht B, Henny H, Horstmann H, Spring H, Faigle W, Spiess E. Influence of 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (12(S)-HETE) on the localization of cathepsin B and cathepsin L in human lung tumor cells. *Eur J Cell Biol* 1997;74(3):294-301.
61. Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H, et al. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem* 1998;273(16):9842-51.

Figure legends

Figure 1: Cathepsin B, H, K and L activities in chondrocytes: Basic activities and stimulation by collagen fragments

Primary chondrocytes were extracted from cartilage by sequential pronase / collagenase digestion and the enzyme activities were detected by the cathepsin assay.

A) Activities of cathepsins B (CB), H (CH), K (CK) and L (CL) in normal human chondrocytes (n=2), in human non OA chondrocytes (n=2) and in human OA chondrocytes (n=30) are indicated. The results are shown as artificial fluorescence units (AFU) and the values represent the mean \pm SD. Significant differences of cathepsin activities are indicated by asterisks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

B) Primary chondrocytes of 2 OA knees (patient 1: male, 76 years; patient 2: male, 53 years) and of a normal knee (patient 3: female, 47 years) were cultured in presence of different collagen fragments (colf, 1mg/ml; col2f, 0.5 mg/ml; Ntelo, 0.5 mg/ml) for 3 days. Cathepsins activities are indicated relative to unstimulated controls. The horizontal line in B represents the reference values (set to 1). Significant differences between the activities in stimulated vs. unstimulated chondrocytes are indicated by asterisks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Figure 2: Dose-response of the effect of the synthetic N-telopeptide on cathepsin B, L and K in chondrocytes

Primary chondrocytes were isolated from OA cartilage and subsequently cultured in DMEM plus 1% FCS in the presence of increasing concentrations of Ntelo. Cathepsin mRNA levels were detected by quantitative real-time PCR. Values represent the mean \pm SD from triplicates. Significant differences between mRNA concentrations of stimulated vs. unstimulated chondrocytes are indicated by asterisks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

A: Incubation of chondrocytes with increasing concentrations of Ntelo for 72h, effect on the cathepsin B, K and L mRNA concentration using β -actin for normalization.

B: Incubation of chondrocytes with saturating concentrations of Ntelo for 24h, effect on cathepsin K mRNA concentration.

C: Primary bovine chondrocytes (open) and human chondrocytes isolated from a patient suffering from OA (black) were cultured in DMEM plus 1% FCS in the presence of varying concentrations of Ntelo for 72 hours. The activities of cathepsins B (CB), H (CH), K (CK) and L (CL) in dependence of the Ntelo concentrations were detected by the cathepsin assay. Activities are given in relative artificial fluorescence units (AFU). Significant differences between the activities in stimulated vs. unstimulated chondrocytes are indicated by asterisks (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 3: Effect of the synthetic N-telopeptide on the secretion of procathepsins by chondrocytes

Primary chondrocytes (hCh) were isolated from an OA patient and subsequently cultured in DMEM plus 1% FCS in the presence of varying concentrations of Ntelo for 72 hours. Procathepsins B, K and L (proCB, proCK and proCL, respectively) secreted into the culture media were determined by immunoblotting. Culture media were separated by SDS-PAGE under reducing conditions, blotted onto nitrocellulose membranes, allowed to react with

polyclonal rabbit antibodies to individual human cathepsins and thereafter with a monoclonal POD labelled antibody to rabbit IgG, and finally developed with the enhanced chemiluminescence method. The molecular weight standards, in kDa, are indicated at the right margin. The lanes +FCS/-FCS represent cell free culture medium controls.

Figure 4:

Effects of synthetic N-telopeptide and extracellular Ca^{2+} on cathepsin K activities in human chondrocytes

Primary chondrocytes were precultured in DMEM plus 5% fetal calf serum (FCS) for 24 hours in 96-well microtiter plates at a density of 10^5 cells per well. After this pretreatment chondrocytes were cultured with calcium-free DMEM or the same medium containing 1mM CaCl_2 . The activity of cathepsin K was measured in absence or presence of Ntelo (1mg/ml). The results are shown as artificial fluorescence units (AFU) and the values represent the mean \pm SD.

Figure 5:

Effect of synthetic N-telopeptide on protein kinase C (PKC) in human chondrocytes

- A. Primary human chondrocytes were isolated from two OA patients (patient 1: P1, female, 78 years; patient 2: P2, female, 66 years) and subsequently incubated with either the Ntelo (1 mg/ml) for 60 min or with PDBu (100 ng/ml) for 20 min. Cell lysates were separated by SDS-PAGE under reducing conditions, blotted onto nitrocellulose membranes, allowed to react with an monoclonal antibody recognizing PKC. Thereafter, membranes were stripped off the signals and again allowed to react with a monoclonal antibody recognizing phospho-PKC. Development of the blots was performed by the chemiluminescence method (anti-phospho-PKC) and by 4-chloronaphthol staining (pan PKC), respectively. The molecular weight standards, in kD, are indicated at the right margin;
- B. Time course of PKC turnover in the presence of a constant amount of Ntelo;
- C. Dose effect of Ntelo. B, C, same detection of PKC and pPKC as in A.

Figure 6:

Inhibition of the PDBu and N-telopeptide activation of cathepsins B, H, K and L by Bisindolylmaleimide in human chondrocytes

Primary OA chondrocytes were cultured and subsequently treated with PDBu (100 ng/ml) in the absence or presence of the pan PKC-inhibitor Bisindolylmaleimide I (final concentration 240 nM). Bisindolylmaleimide I was added 60 min before the addition of PDBu and Ntelo, respectively. Cathepsin activities were measured after different time periods of incubation with PDBu. The results are shown as artificial fluorescence units (AFU) and the values represent the mean \pm SD. Significant differences between pairs of enzyme activities are indicated by asterisks (* $p < 0.05$).

Left panel: Effect on the activation by PDBu

Right panel: Effect on the activation by Ntelo.

Acknowledgements.

For providing us the cathepsin K inhibitor Z-Leu-Gly-{CN}. we would like to acknowledge Reik Löser and Michael Gütschow, Pharmaceutical Institute Poppelsdorf, University of Bonn.

Figure 1:

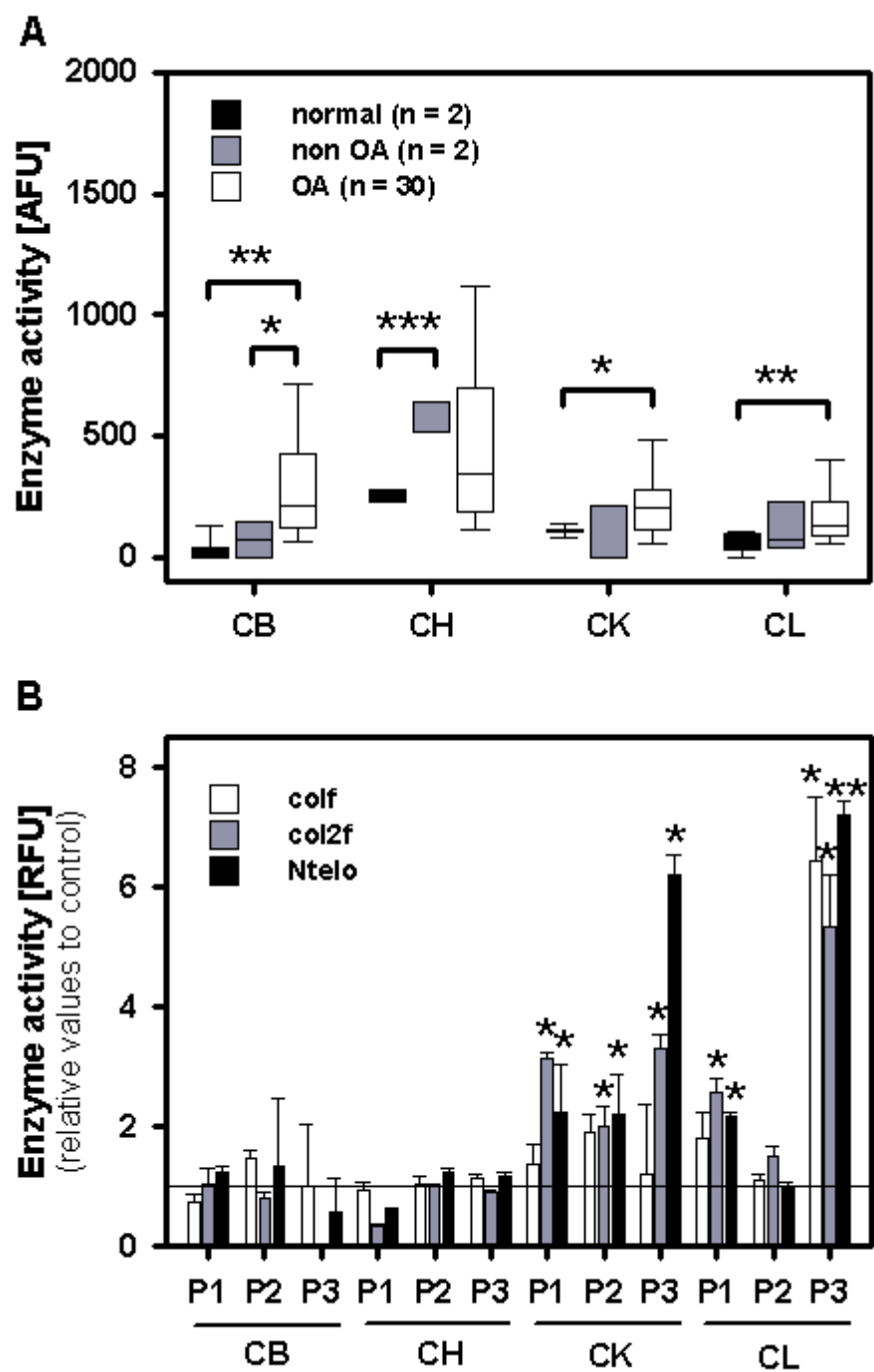


Figure 2:

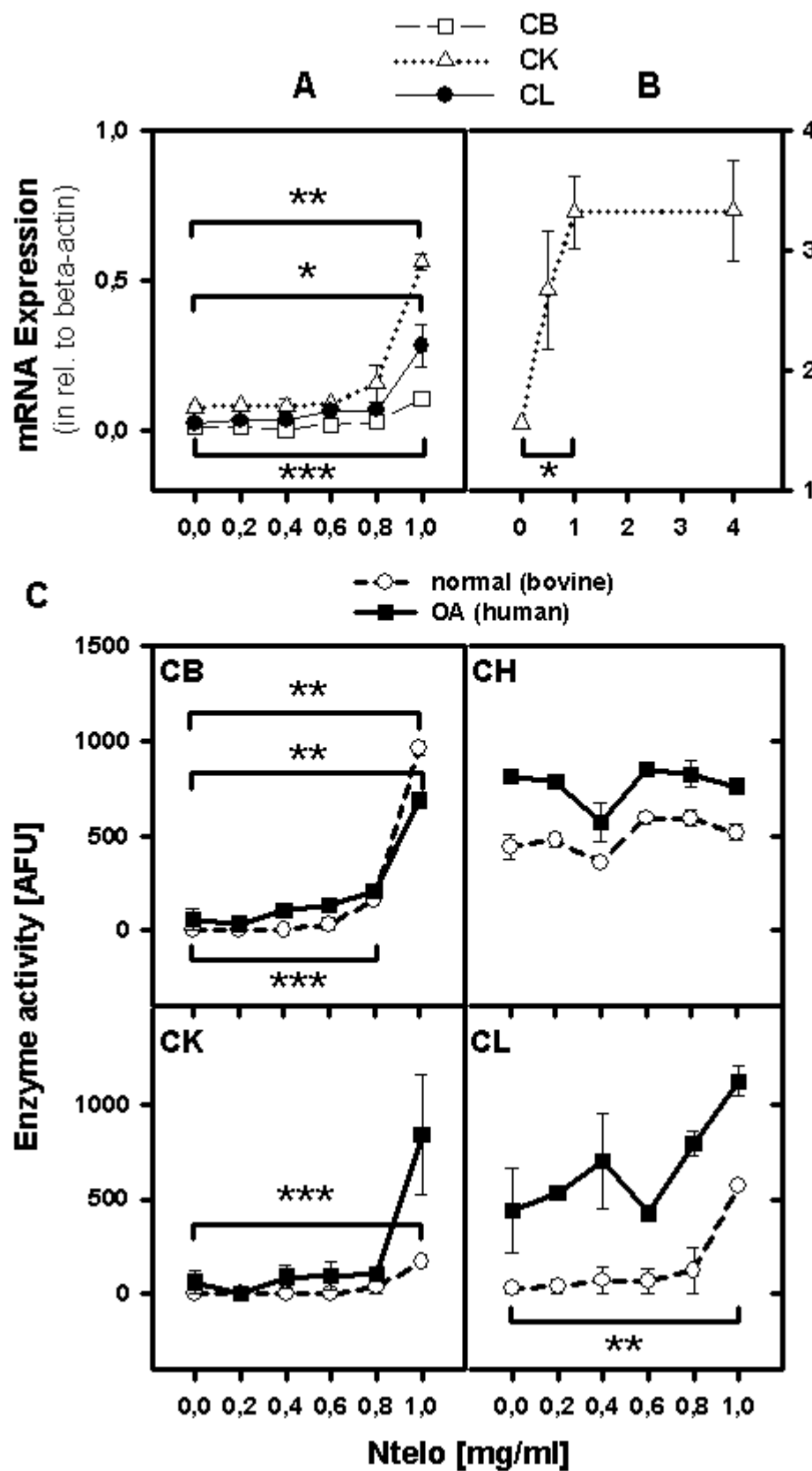


Figure 3:

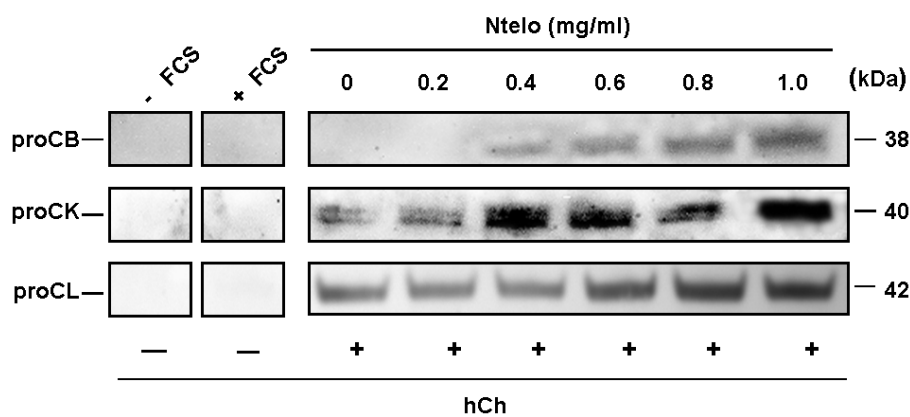


Figure 4:

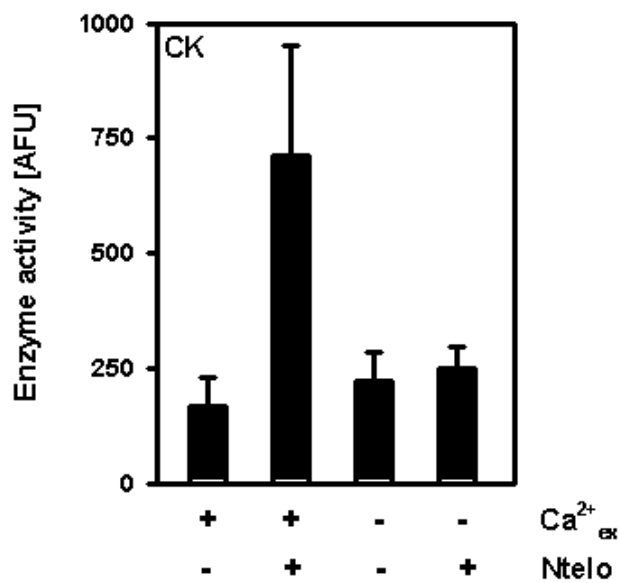


Figure 5:

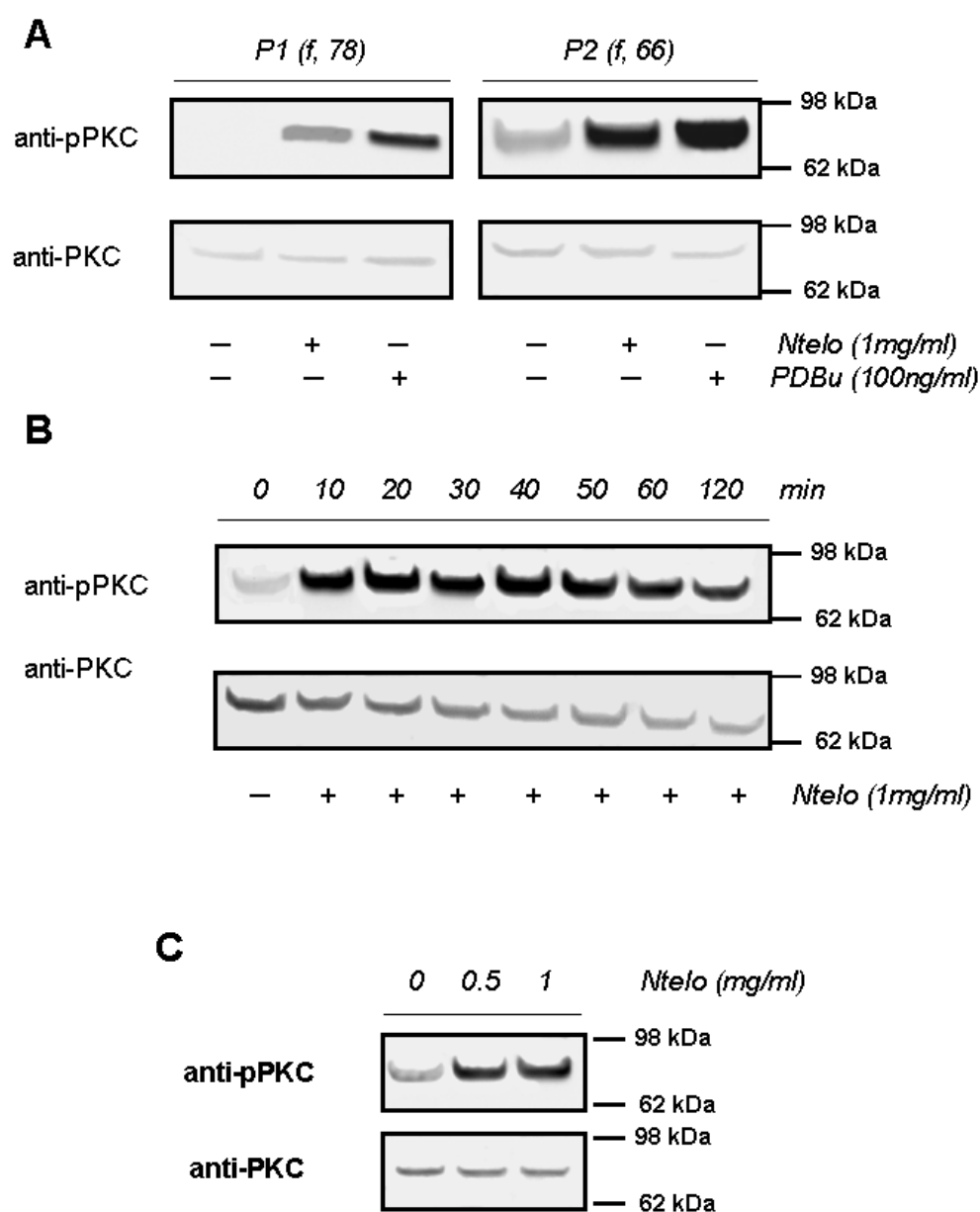
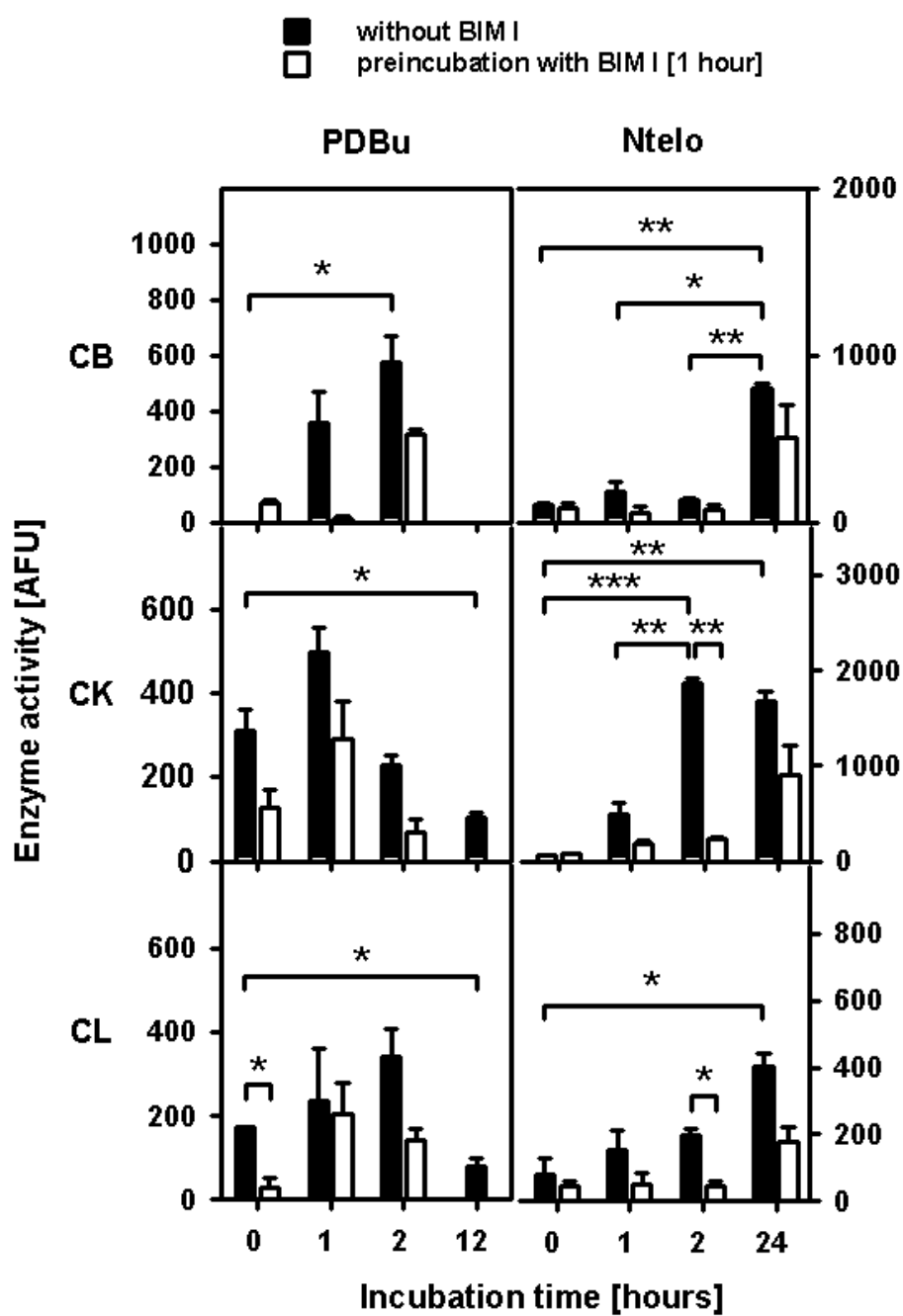


Figure 6:



3.4 Manuskript 4

Title:

Intraartikulärer Schmerz bei Gonarthrose: Ein Fallbericht über eine stark erhöhte Expression der Cathepsine in Chondrozyten.

C Müller^{1,2}, B Wiederanders², R Fuhrmann¹, RA Venbrocks¹, A Rüttger^{1,2}

¹ Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ gGmbH mit Lehrstuhl für Orthopädie des Universitätsklinikums, Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Eisenberg

² Institut für Biochemie I des Universitätsklinikums, Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Short Title:

Intraartikulärer Schmerz bei Gonarthrose und Cathepsine.

Mini-Zusammenfassung:

Insgesamt 31 Patienten mit einer Gonarthrose wurden in eine Studie aufgenommen, um die Relevanz der Cysteinproteasen zu untersuchen. Der Nachweis einer stark erhöhten Expression der Cathepsine bei einer Patientin ohne wesentliche Knorpeldegradation stellt die essentielle Beteiligung der Cathepsine am Kollagenturnover in Frage.

Zusammenfassung:

Studienziel: Literaturdaten weisen den Cysteinproteasen neben den Matrixmetallproteasen eine wichtige Funktion für den Kollagenturnover zu. Sie werden von der pharmazeutischen Industrie zunehmend als Targets für die therapeutische Intervention bei solchen degenerativen Gelenkerkrankungen angesehen, die mit einem massiven Verlust des Knorpels einhergehen.

Methoden und Ergebnisse: Vorgestellt wird hier der Fall einer 69-jährigen Patientin, die wegen erheblicher Schmerzsymptomatik bei vordergründiger Retropatellararthrose mit einer Knie-Totalendoprothese versorgt wurde. Isolierte Chondrozyten aus dem Knorpelresektat zeigten eine im Vergleich zum gesamten Patientenkollektiv (n=30) signifikant erhöhte Expression der Cathepsin-mRNA und der entsprechenden Enzymaktivitäten. Außerdem waren mRNA und Protein des endogenen Inhibitors dieser Proteasen, Cystatin c, nahezu nicht nachweisbar.

Schlussfolgerung: Der Befund stellt die essentielle Beteiligung der Cysteinproteasen am Kollagenturnover und damit auch den in Entwicklung befindlichen therapeutischen Ansatz in Frage.

Schlüsselwörter:

Retropatellararthrose, Cathepsine, Gonarthrose, Chondrozyten, MMPs

Abstract:

Aim: Cysteine proteases as cathepsins K and L as well as matrix metallo proteases are considered to be basically involved in collagen turnover. Degenerative joint diseases as knee arthritis are characterized by massive cartilage degradation mediated by increased activities of these proteases. These enzymes are, therefore, interesting targets for the treatment of painful arthritic joints.

Method and Results: We report on a 69 year old female suffering from severe pain due to predominant retropatellar arthritis. During endoprosthetic replacement we were able to harvest cartilage probes. We isolated the chondrocytes from the joint cartilage and determined the mRNA and the activities of cathepsins B, K, H and L. Compared to chondrocytes isolated from the controls (30 patients) we found the activity of cysteine proteases to be extremely enhanced. Moreover, the concentration of cystatin c, an endogenous inhibitor of cathepsins, was not detectable.

Conclusion: The results raise doubts on the predominant role of cysteine proteases in severe cartilage destruction.

Keywords:

Retropatellar arthrosis, Cathepsins, gonarthrosis, Chondrocytes, MMPs

Einleitung:

Entzündliche und degenerative Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrose und rheumatoide Arthritis sind durch den allmählichen Verlust der organischen Grundsubstanz des Gelenkknorpels gekennzeichnet. Diese besteht vorwiegend aus dem Typ II Kollagen und damit verbundenen Glucosaminoglykanen (1). Die bekannten Konsequenzen sind vor allem die Ersatzreaktionen der aktivierten Fibroblasten und Chondrozyten mit Synthese des für die Gelenkfunktion nutzlosem Typ I Kollagen sowie anschließender Fibrosierung (2). Eine sinnvolle therapeutische Option könnte darin bestehen die Enzyme zu hemmen, die für den Abbau des Typ II Kollagens im befallenen Knorpel verantwortlich sind.

Durch seine kompakte Struktur ist das Kollagenmolekül nur von sehr wenigen Proteasen angreifbar (3). Seit langem werden Matrixmetallproteasen (vor allem MMP 3 und 13) und Cysteinproteasen (vor allem die Cathepsine B, L und K) als diejenigen Enzyme diskutiert, die für den Abbau von nativem Kollagen überhaupt in Frage kommen. Zahlreiche Studien belegen, dass in entzündeten und arthrotischen Gelenken die Aktivitäten der MMP's und einiger Cathepsine erhöht sind (4-10).

Die oben erwähnte therapeutische Option einer selektiven und lokal begrenzten Hemmung der erhöhten Proteaseaktivitäten stößt in der Praxis auf verschiedene Schwierigkeiten. Zum einen handelt es sich bei den genannten Enzymen keineswegs um solche, die nur in Gelenken vorkommen oder ausschließlich von Chondrozyten synthetisiert werden. Sie üben im Gegenteil eine Vielzahl physiologischer Funktionen aus (11,12). Inhibitoren könnten deshalb nicht generell appliziert werden. Zum zweiten stellt die Synthese selektiver

Protease-Inhibitoren ein großes strukturchemisches Problem dar, das keineswegs befriedigend gelöst ist (13,14). Ein drittes Problem besteht darin, dass wir nicht wissen, ob mit der Hemmung einer Protease-Aktivität tatsächlich das gesamte kollagenolytische Potential des betroffenen Gelenks unterdrückt werden kann.

Mit dem hier vorgelegten Fallbericht wollen wir darüber hinaus verdeutlichen, dass die Bedeutung der Cysteinproteasen für den pathologisch erhöhten Kollagen Typ II Abbau in einem arthrotisch veränderten Gelenk nicht überschätzt werden darf und mit der Hemmung einer Protease oder eines Proteasetyps unter Umständen gar nicht der „main player“ der Destruktion getroffen wird.

Patienten / Material und Methoden:

Anamnese und klinischer Befund

Eine 69-jährige Patientin (Body Mass Index 32.1) stellte sich mit seit Jahren persistierenden Knieschmerzen unter Belastung und in Ruhe vor. Physiotherapie und systemisch analgetische Medikation hatten zu keiner dauerhaften Beschwerdelinderung geführt. Nur durch die intraartikuläre Applikation von Lokalanästhetika und Kortikoiden konnte eine vorübergehende Schmerzlinderung erzielt werden.

Bei der klinischen Untersuchung zeigte sich eine orthograde Beinachse mit nahezu seitengleichem Muskelumfang. Das Gangbild war durch ein Schonhinken rechts gekennzeichnet. Bei der Palpation klagte die Patientin über Druckschmerzen in Höhe des medialen und lateralen Gelenkspalts. Eine Ergussbildung im Kniegelenk lag nicht vor. Die Verschieblichkeit der Patella war deutlich schmerzhaft eingeschränkt. Der Bewegungsumfang für Extension/Flexion betrug 0/0/110°, wobei ein endgradiger Flexionsschmerz beklagt wurde. Weiterhin ließen sich deutliche Krepitationen retropatellar tasten. Die Bandführung war stabil.

Anamnestisch waren eine Katarakt, eine Lungenembolie (Marcumartherapie) und ein medikamentös eingestellter Hypertonus zu erfragen. Vor 10 Jahren war eine Hüftendoprothese mit gutem Langzeitergebnis implantiert worden.

Bildgebende Diagnostik

Die angefertigten Röntgenbilder des rechten Kniegelenks in antero-posteriorer Projektion unter Belastung und im seitlichen Strahlengang zeigten die Gelenkveränderungen einer mäßigen Gonarthrose. Neben der verstärkten subchondralen Sklerosierung des Tibiaplateaus und den osteophytären Ausziehungen der Kreuzbandhöcker war die retropatellare Arthrose der radiologisch führende Befund (Abb. 1A, B).

Therapie

Trotz der nur endgradig eingeschränkten Kniegelenksfunktion und dem radiologischen Bild einer vordergründigen Retropatellararthrose erfolgte die Indikationsstellung zur Implantation einer Kniegelenks-Totalendoprothese. Diese Entscheidung wurde insbesondere unter

Berücksichtigung der zu diesem Zeitpunkt kaum noch beherrschbaren Schmerzsymptomatik und dem guten Ansprechen auf intraartikuläre Injektionen getroffen.

Bei komplikationslosem perioperativen Verlauf berichtete die Patientin rasch über eine deutliche Schmerzlinderung.

Ergebnisse:

Methodik und Verlauf der biochemischen Analytik

Bei der betreffenden Patientin wurden aus den während der Knie-Totalendoprothesenimplantation anfallenden Resektaten Knorpelbiopsien steril entnommen. Dies geschah im Rahmen einer Studie (31 Patienten), die die Bedeutung der Cysteinproteasen bei der Gonarthrose näher beleuchten sollte.

Das humane Probenmaterial wurde gemäß den Richtlinien der Ethikkommission (# 1772-04/06) unserer Universität gewonnen und analysiert.

Durch sequentiellen Verdau des Knorpels mit Pronase / Kollagenase wurden Chondrozyten isoliert, kultiviert und biochemisch analysiert. Die Aktivität der Cathepsine B, H, K und L in vitalen Chondrozyten wurde mit einem Fluoreszenzassay detektiert (15). Im Vergleich zum gesamten Patientenkollektiv (n=30) wurde bei der Patientin eine signifikant erhöhte Aktivität der Cathepsine H, K und L konstatiert (Abb. 2). Dieser auffällige Befund legte es nahe, auch die Transkriptionsebene zu untersuchen. Dazu wurde die mRNA der Cathepsine B, H, K und L in den Chondrozyten mittels quantitativer real time PCR bestimmt. Als Kontrollen dienten 10 zufällig ausgewählte Vertreter des Gesamtkollektivs. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte über die β -Aktin-mRNA. Die Auswertung ergab eine ebenfalls signifikant erhöhte mRNA-Expression der Cathepsine B, H, K und L bei der beschriebenen Patientin im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Abb. 3). Außerdem war der endogene Inhibitor der Cysteinproteasen, das Cystatin C, sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene nicht detektierbar. Diese auffälligen Ergebnisse legten es nahe, eine genetische Ursache dieser Besonderheit anzunehmen. Deshalb untersuchten wir das Expressionsprofil dieser Proteine auch noch in peripheren weißen Blutzellen dieser Patientin. Hier ergaben sich jedoch im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (n=2) keinerlei Unterschiede. Eine parallel vom Institut für Humangenetik unserer Universität angefertigte Chromosomenanalyse ergab keinen Hinweis auf eine genetische Aberration.

Die statistische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm SPSS 9.0 (SPSS-Inc., Chicago, Illinois, USU) durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert der Standardabweichung angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem *t*-Test für unabhängige Proben bestimmt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Diskussion:

Arthrosen des Kniegelenks nehmen bei der steigenden Lebenserwartung einen bedeutenden Stellenwert im Gesundheitswesen ein (16). Wenngleich die aktuellen operativen Behandlungsmöglichkeiten der Gonarthrose (Achsenkorrekturen, lokale Knorpeltherapie durch osteochondrale Transplantationen oder autogene Chondrozytentransplantationen)

zunehmend auf frühe Stadien der Arthrose zielen, steigt die Anzahl der Knieendoprothesen stetig (17).

Im Kontext einer multifaktoriellen Genese der Osteoarthrose wird die Bedeutung knorpeldegradierender Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Cysteinproteasen kontrovers diskutiert. Die experimentellen Analysen verdeutlichen zwar die Relevanz der MMPs und der Cysteinproteasen für die Matrixdegradation bei degenerativen und entzündlichen Gelenkerkrankungen (3,4,6,8-10), aber ein umfassendes Bild über den Beitrag jeder einzelnen Protease fehlt. Im Rahmen einer Serie von Untersuchungen zur Bedeutung der Cysteinproteasen bei der Gonarthrose bestimmten wir die mRNA-Spiegel und die Aktivitäten dieser Enzyme in Chondrozyten einer Reihe von Patienten, denen wegen ähnlicher Symptome Kniegelenkendoprothesen implantiert wurden. Bei einer Patientin fielen dabei signifikant erhöhte Werte der Expression der Cathepsine im Vergleich zum gesamten übrigen Patientenkollektiv auf. Auf mRNA-Ebene waren das für die beiden Cathepsine B und H weit über 50-fach höhere Werte als beim Durchschnitt aller anderen Patienten (s. Abb. 3). Baici et al. messen dem Cathepsin B dabei sogar eine ganz besonders große Bedeutung für den Knorpelabbau bei der Arthrose zu (10).

Der von uns eingesetzte Fluoreszenzassay zur Bestimmung der *in vivo* Aktivitäten der Cathepsine (15) erlaubt im Gegensatz zu Enzymbestimmungen in Zellhomogenaten die Quantifizierung der tatsächlich in den Zellen ablaufenden Prozesse. Dabei konnten wir zwar die extrem über dem Durchschnitt liegenden Werte der mRNA-Konzentrationen für die Cathepsine B und H nicht auf Aktivitätsebene gespiegelt finden, aber die Aktivität vom Cathepsin K, das ein außerordentlich großes Potential zum Abbau von nativem Kollagen besitzt (3), war etwa 10-fach gegenüber den Werten des Kontrollkollektivs erhöht. Zusammen mit der Tatsache, dass die Expression des endogenen Inhibitors der Cysteinproteasen, des Cystatin c, nicht messbar war, sprachen also alle Befunde dafür, dass in den Chondrozyten dieser Patienten eine weit über dem Durchschnitt liegende Aktivität von Cysteinproteasen vorlag. Dieser Befund korrelierte nicht mit der nur endgradig behinderten Kniegelenksfunktion und einer nur unwesentlich erscheinenden Veränderung der übrigen Gelenkstruktur, in der röntgenologisch vordergründigen lediglich eine Retropatellararthrose sichtbar ist (s. Abb. 1B). Auffällig war jedoch die ungewöhnlich starke Schmerzhaftigkeit und die Tatsache, dass intraartikuläre Injektionen zur Beschwerdelinderung führten, so dass eine intraartikuläre Ursache der Beschwerden anzunehmen war. Wir haben jedoch in der Literatur keine Hinweise darauf erhalten, dass durch die Wirkung von Cathepsinen schmerzauslösende Peptide freigesetzt werden könnten.

Die Ursache der erhöhten Cathepsin-Expression ist nicht weiter untersucht worden. Da in anderen Körperzellen der Patientin eine normale Expression der Cathepsine gemessen wurde, kommt dafür nur ein lokaler Prozess in Frage. Eine aktuelle Exazerbation des entzündlichen Prozesses kann zwar zur Freisetzung von Zytokinen führen, die ihrerseits die Aktivierung der Chondrozyten mit einer erhöhten Produktion von Proteasen bedingen (18,19). Die Schmerzsymptomatik der Patientin hatte jedoch chronischen Charakter, so dass ein aktuelles Geschehen eher auszuschließen ist. In einer noch nicht veröffentlichten Studie konnten wir zeigen, dass Abbaupeptide des Typ II Kollagens die Synthese von Cathepsinen in Chondrozyten anschalten. Das könnte zumindest im vorliegenden Fall eine Erklärung für die lokale Erhöhung der Syntheseleistung der Chondrozyten abgeben. Unterstellt man, wie bislang angenommen, einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Cysteinproteasen

und dem Ausmaß der Knorpeldegradation, so muss dies zumindest für die charakterisierte Patientin relativiert werden.

Schlussfolgerung:

Enzyme der Knorpeldegradation wie MMPs und Cysteinproteasen werden in zunehmendem Maß als Targets für die medikamentöse Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen angesehen. Der vorliegende Fall zeigt, dass die Aktivität der Cysteinproteasen nicht zwingend mit dem Ausmaß der Gonarthrose korreliert, so dass die Cysteinproteasen auf keinen Fall das alleinige Ziel einer derartigen Inhibitortherapie sein sollten.

Literaturverzeichnis:

1. Young, A.A., M.M. Smith, S.M. Smith, M.A. Cake, P. Ghosh, R.A. Read, J. Melrose, D.H. Sonnabend, P.J. Roughley and C.B. Little. Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:R852-861.
2. Miosge, N., K. Waletzko, C. Bode, F. Quondamatteo, W. Schultz and R. Herken. Light and electron microscopic in-situ hybridization of collagen type I and type II mRNA in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6:278-285.
3. Li, Z., W.S. Hou and D. Bromme. Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates. *Biochemistry* 2000; 39:529-536.
4. Glasson, S.S., R. Askew, B. Sheppard, B. Carito, T. Blanchet, H.L. Ma, C.R. Flannery, D. Peluso, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005; 434:644-648.
5. Mort, J.S. and C.J. Billington. Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. *Arthritis Res* 2001; 3:337-341.
6. Hellio Le Graverand, M.P., J. Eggerer, P. Sciore, C. Reno, E. Vignon, I. Otterness and D.A. Hart. Matrix metalloproteinase-13 expression in rabbit knee joint connective tissues: influence of maturation and response to injury. *Matrix Biol* 2000; 19:431-441.
7. Uusitalo, H., A. Hiltunen, M. Soderstrom, H.T. Aro and E. Vuorio. Expression of cathepsins B, H, K, L, and S and matrix metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. *Calcif Tissue Int* 2000; 67:382-390.
8. Keyszer, G., A. Redlich, T. Haupl, J. Zacher, M. Sparmann, U. Engethum, S. Gay and G.R. Burmester. Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1378-1387.
9. Lang, A., D. Horler and A. Baici. The relative importance of cysteine peptidases in osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000; 27:1970-1979.
10. Baici, A., A. Lang, D. Horler, R. Kissling and C. Merlin. Cathepsin B in osteoarthritis: cytochemical and histochemical analysis of human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:289-297.

11. Lecaille, F., J. Kaleta and D. Bromme. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* 2002; 102:4459-4488.
12. Mott, J.D. and Z. Werb. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:558-564.
13. Bigg, H.F. and A.D. Rowan. The inhibition of metalloproteinases as a therapeutic target in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1:314-320.
14. Wiederanders, B., G. Kaulmann and K. Schilling. Functions of propeptide parts in cysteine proteases. *Curr Protein Pept Sci* 2003; 4:309-326.
15. Ruttger, A., J. Mollenhauer, R. Loser, M. Gutschow and B. Wiederanders. Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy-beta-naphthylamide. *Biotechniques* 2006; 41:469-473.
16. Swoboda, B. Aspekte der epidemiologischen Arthroseforschung. *Der Orthopäde* 2001; 30:834-840.
17. Bader, R., W. Mittelmeier and E. Steinhauser. Versagensanalyse von Knieendoprothesen. *Der Orthopäde* 2006; 35:896-903.
18. Schurigt, U., N. Stopfel, M. Huckel, C. Pfirschke, B. Wiederanders and R. Brauer. Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:R174-188.
19. Kaneko, M., T. Tomita, T. Nakase, Y. Ohsawa, H. Seki, E. Takeuchi, H. Takano, K. Shi, K. Takahi, E. Kominami, Y. Uchiyama, H. Yoshikawa and T. Ochi. Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40:247-255.

Danksagung und Angaben zur finanzieller Unterstützung

Die Autoren danken den beteiligten Mitarbeitern des Waldkrankenhauses „Rudolf Elle“ Eisenberg für ihr Engagement. Besonderer Dank gebührt Hardi Hauk für die Bearbeitung der Röntgenbilder.

Dem Institut für Humangenetik der Friedrich-Schiller-Universität Jena, unter Leitung von Prof. Uwe Claussen, danken wir für die Durchführung der Chromosomenanalyse.

Für die finanzielle Unterstützung gebührt unser Dank dem Interdisziplinärem Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) an der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Liste aller Legenden:

Abbildungslegenden

Abbildung 1: Präoperative Röntgenbilder des rechten Kniegelenks, A: a.p., B: seitlich.

Abbildung 2: Aktivität der Cathepsine B, H, K und L in OA-Chondrozyten. Die Angabe der Aktivitäten erfolgt in artifiziellen Fluoreszenzeinheiten (AFU).

Abbildung 3: mRNA-Expression der Cathepsine B, H, K und L in OA-Chondrozyten. Die Konzentration des housekeeping Gens β -Aktin wurde mit 1 angenommen und die gemessenen mRNA Konzentrationen der 4 Cathepsine darauf bezogen.

Abbildungen:

Abbildung 1

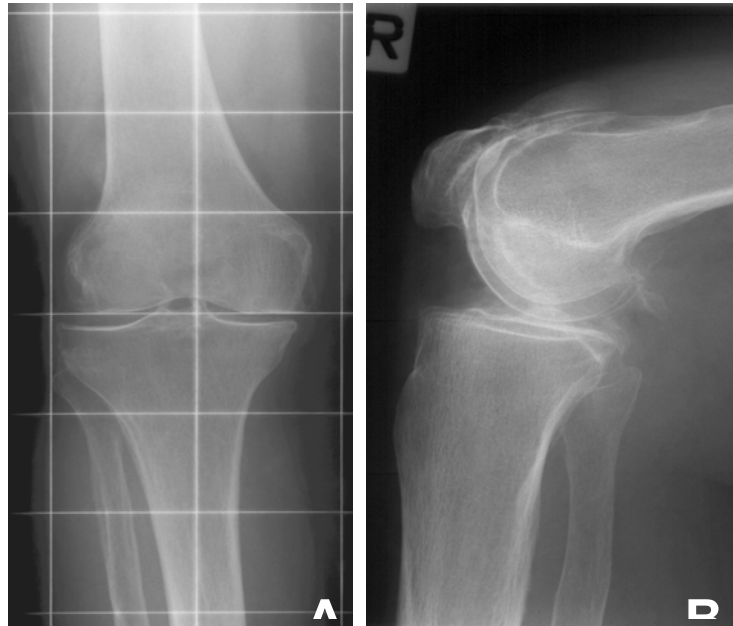


Abbildung 2

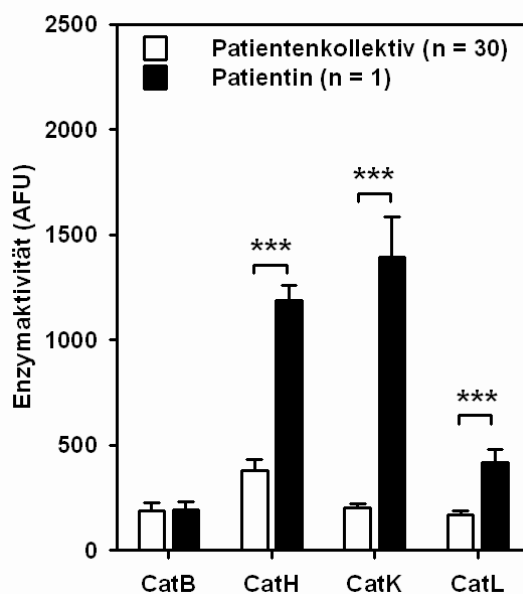
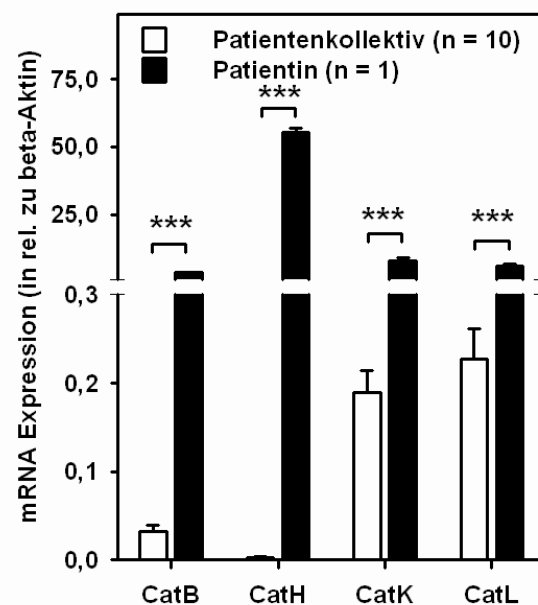


Abbildung 3



4 Diskussion

Viele der für die Osteoarthritis charakteristischen Veränderungen des Knorpels sind von der Aktivität proteolytischer Enzyme abhängig. In der Literatur ist die Beteiligung der Matrix-Metalloproteinasen beim Matrixabbau bei der Osteoarthritis gut belegt [Jennings, 2001; Fichter, 2006; Milner, 2006; Murphy, 1993; Okada, 2000]. Obwohl dafür auch schon seit geraumer Zeit vor allem die Bedeutung von Cathepsin K diskutiert wird [Kontinen, 2002; Morko, 2004], ist dessen Rolle sowie die der übrigen Cathepsine bei der OA nicht systematisch geklärt.

4.1 Weiterentwicklung des Cathepsin-Assay

Um die Relevanz der Cathepsine B, H, K und L bei der Osteoarthritis untersuchen und verstehen zu können, bedarf es sowohl der Analyse der Transkription und Translation als auch der Enzymaktivität. Denn letztendlich ist die Aktivität proteolytischer Enzyme entscheidend für den Abbau von Matrixbestandteilen, nicht nur die mRNA- und Proteinmenge.

Die Bestimmung der Aktivitäten verschiedener Cathepsine wurde schon zahlreich in der Literatur beschrieben [Dolbeare, 1977, 1979; Graf, 1982; Assfalg-Machleidt, 1992; Boonacker, 2001]. In bis dato allen Arbeiten wurde die Enzymaktivität in Zell-Lysaten, Gefrierschnitten, in fixierten Zellen und unter Zugabe von aktivierenden Substanzen wie beispielsweise DTT und Cystein bestimmt. Um besonders aussagekräftige Daten zur Aktivität der Cathepsine *in vivo* zu erhalten, besonders im Hinblick auf eine spätere Anwendung der Methode, wurde die bereits in meiner Diplomarbeit vorgestellte Methode weiterentwickelt.

In Rüttger et al. (2006) haben wir den Cathepsin-Assay mit seinen Möglichkeiten und Grenzen beschrieben. Abbildung 6 veranschaulicht die Vorgehensweise zur quantitativen, selektiven Bestimmung der Cathepsine B, H, K und L in vitalen Zellen. Dazu wurden verschiedene selektive 4-Methoxy- β -Naphthylamid-Derivate und Peptidyl-Inhibitoren verwendet. Das Prinzip der Methode beruht auf einer Differenzmessung zwischen einem ungehemmten Ansatz und einem Ansatz, der den selektiven Inhibitor enthält. Die Bestimmung der Aktivität von Cathepsin H folgt, aufgrund des Fehlens eines spezifischen Cathepsin H-Inhibitors, einem anderen Prinzip. Durch die Inkubation mit H-R-4-M β NA und Bestatin, einem Inhibitor zytosolischer Aminopeptidasen, wird nach Abzug der NSA-Eigenfluoreszenz die Cathepsin H-Aktivität direkt ermittelt.

Die Substratspezifität von Peptidasen wird durch die Aminosäuren definiert, die N- und C-terminal von der zu spaltenden Peptidbindung liegen und damit die Ladung und Hydrophobizität bestimmen, die für die Annäherung an das katalytische Zentrum notwendig sind [Berger, 1970]. Dementsprechend ist die Substratspezifität von Peptidasen in der Regel nicht sehr ausgeprägt. „Selektive“ Substrate und Inhibitoren werden häufig durch

verschiedene Peptidasen angegriffen, bestenfalls unterscheiden sich die K_m - und K_i -Werte. Die Problematik der geringen Substratspezifität von Peptidasen wurde im Vergleich zu den Arbeiten der Arbeitsgruppen von Spiess und Machleidt durch die Verwendung zweier selektiver Parameter (Substrat und Inhibitor) bei unserem Ansatz entscheidend verbessert [Assfalg-Machleidt, 1992; Ulbricht, 1995]. Der Cathepsin-Assay kann, in der von uns beschriebenen Ausführung, ausschließlich bei adhären wachsenden Zellen Anwendung finden. Die humane Zelllinie HEK 293 (*human embryonic kidney*) und primäre Chondrozyten erfüllten diese Voraussetzung und dienten als Modellsysteme.

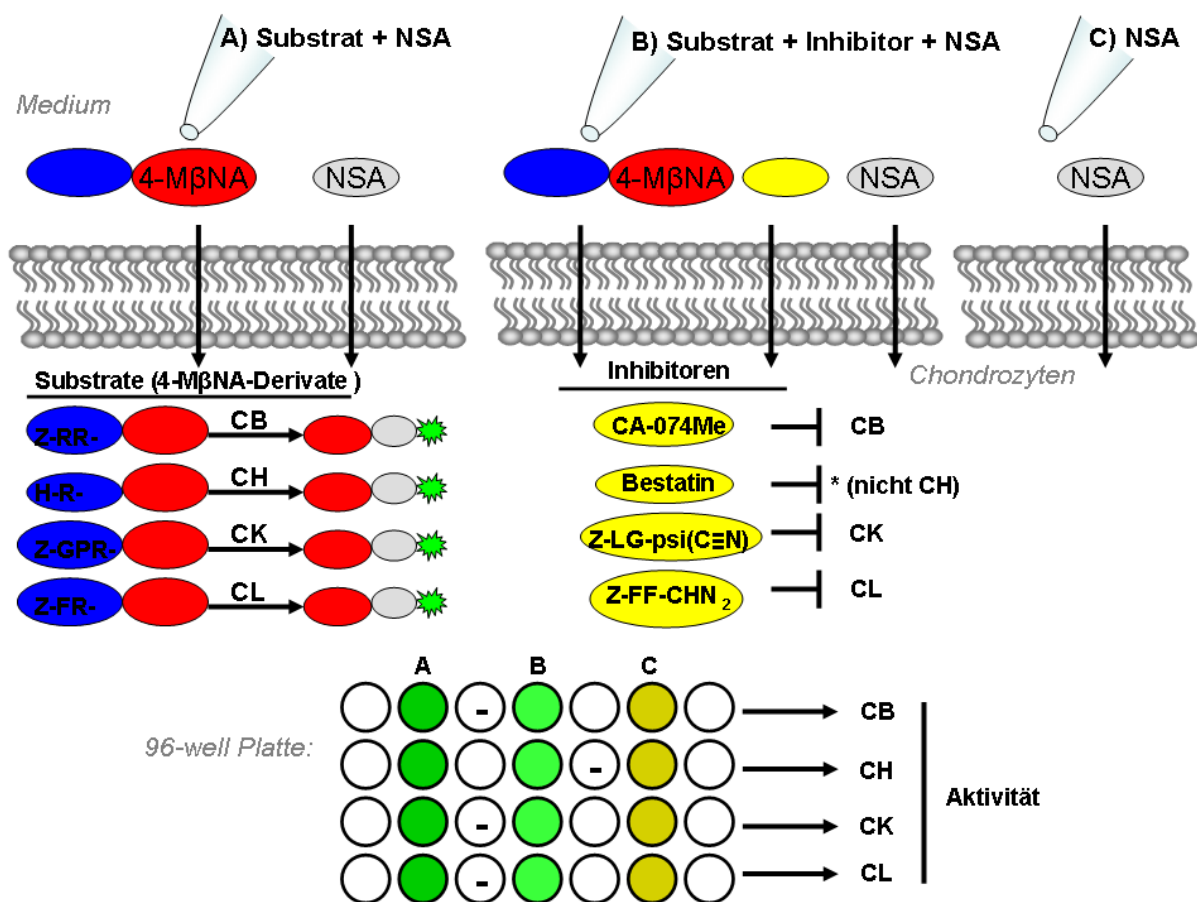


Abb. 6: Das Prinzip des Cathepsin-Assay.

Adhären wachsende Zellen (z.B. Chondrozyten) werden in schwarzen 96 Loch-Mikrotiterplatten mit klarem Boden in einer Zelldichte von 100 000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Zur Bestimmung der Aktivitäten der Cathepsine B, H, K und L werden die entsprechenden Substrate, Inhibitoren und NSA direkt ins serumfreie Medium pipettiert (A: ungehemmter Ansatz, B: gehemmter Ansatz, C: Kontrollansatz). Die verwendeten Substrate und Inhibitoren sind der Abbildung zu entnehmen. Nach einer zweistündigen Inkubation im Brutschrank werden die Zellen mit 100 µl PBS äquilibriert. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenz-Imager.

Unsere Strategie zielte auf eine Optimierung des Assays, um diesen im Rahmen einer Studie zur Bedeutung der Cathepsine bei der OA anwenden zu können.

Basierend auf den Resultaten aus der Diplomarbeit sollten verschiedene Parameter variiert werden. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung von schwarzen Mikrotiterplatten mit

weißem Boden zum einen die Überwachung der kultivierten Zellen sicherte und zum anderen einen hohen Probendurchsatz ermöglichte.

Durch die Zusammenarbeit mit Prof. M. Gütschow und Dr. R. Löser, die in einer gemeinsamen Veröffentlichung mündete, konnte der spezifische Cathepsin K-Inhibitor Z-LG-ψ[C≡N] zum Einsatz kommen [Loeser, 2005]. Dies war Voraussetzung um die Aktivität von Cathepsin K valide detektieren zu können.

Die Qualität unserer Methode überprüften wir mit zwei unabhängigen Experimenten. Zum einen verglichen wir die Aktivitäten der Cathepsine B, H, K, und L in Zellen von Wildtyp- und den jeweiligen *knockout*-Mäusen. Dazu wurden die gewonnenen Peritoneal-Makrophagen der entsprechenden männlichen Tiere verwendet [Brune, 1984]. Die *knockout*-Zellen zeigten keine Aktivität. Zum anderen führte der Einsatz des Cysteinproteaseninhibitors E-64d zu einer durchschnittlich 80%igen Inhibition der Aktivität der Cathepsine. Die Abbildung 7 zeigt die Resultate der zwei unabhängigen Experimente im Detail.

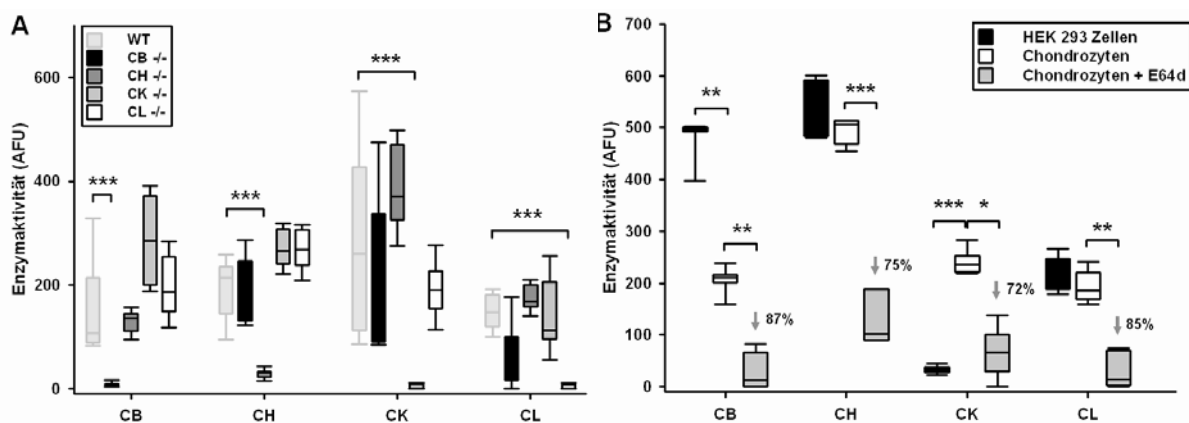


Abb. 7: Validierung des Cathepsin-Assays.

Neben der Validierung des Cathepsin-Assays mit *knockout*-Makrophagen (A, *** $p < 0,001$; signifikant gegenüber WT-Makrophagen) konnte die Spezifität der entwickelten Methode ebenfalls mit dem Inhibitor der Cathepsine dem E64d (B, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) unter Beweis gestellt werden. Die grauen Pfeile geben die Inhibition der Enzymaktivität in Prozent an.

Damit sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass der Cathepsin-Assay für eine breite Anwendung durchaus geeignet scheint. Insbesondere die Ergebnisse der Validierung lieferten den Nachweis der Anwendbarkeit des Assays.

Somit konnten in *Rüttger et al. (2006)* die methodischen Voraussetzungen aufgezeigt werden, um die Bedeutung von Cathepsinen bei der OA systematisch aufklären zu können.

Außerdem wird es gelingen, durch die Veröffentlichung des detaillierten Versuchsablaufs in *Rüttger and Wiederanders (2007)* in Current Protocols in Protein Science, die Methode einem breiten Spektrum von Anwendern zugänglich zu machen.

4.2 Verwendetes Untersuchungsmaterial und Methodisches

Um die Voraussetzungen für eine systematische Studie zur Relevanz der Cathepsine bei der OA zu schaffen, kommt der Auswahl von geeignetem Untersuchungsmaterial eine entscheidende Rolle zu. Die Gewinnung von osteoarthrotischen Chondrozyten gestaltete sich unproblematisch. Dafür wurden Resektate von Kniegelenken bei Endoprothesenimplantationen von Patienten mit einer Gonarthrose herangezogen. Diese randomisierte Auswahl ohne Einschränkung von Alter oder weiteren Vorerkrankungen hat zum Teil erhebliche interindividuelle Unterschiede in der Qualität der Knorpelproben zur Folge. Dies ist aber im Rahmen der multifaktoriellen Entstehung der OA und der Diskrepanz in der Lebensweise der einzelnen Patienten nicht anders zu erwarten und deckt sich mit der Literaturlage über die OA [Küttner, 1995; Niethard, 2003].

Bei der Analyse der in Rüttger et al. (2007) gezeigten Daten kristallisierte sich aber ein gravierenderes Problem heraus. Dieses bestand in der ungenügenden Größe des Kontrollkollektivs. Darin konnte nur der Knorpel von zwei Spendern eingeordnet werden. Als humanes Untersuchungsmaterial für die Kontrollgruppen kam Knorpelgewebe zum Einsatz, das bei Amputationen und Exartikulationen anfiel und welches keinen makroskopisch sichtbaren Knorpelschaden aufwies. Das humane Knorpelmaterial zweier Nicht-OA-Patienten konnte nicht in die Kontrollgruppe eingereiht werden, da beide Spender zum einen über 80 Jahre alt waren und zum anderen bereits sichtbare degenerative Knorpelveränderungen zeigten. Das Problem einer gesunden Referenz bei Betrachtungen zum Thema Osteoarthrose wird in der Literatur nicht offensiv diskutiert. Bei der kritischen Auseinandersetzung mit der Literatur stösst man häufig nur in den Materialbeschreibungen auf die Engpässe und die verwendeten Alternativen zum gesunden humanen Knorpel [Reid, 2000; Ruiz-Romero, 2005]. In Ermangelung von ausreichend humanem Normalknorpel griffen wir, unterstützt durch Literaturbelege, auf bovinen Knorpel für unsere Untersuchungen zurück [Reid, 2000; Fichter, 2006]. Diese Probleme zeigen deutlich, dass die Suche nach Alternativen in Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen wird. Möglicherweise zeigen bereits kommerziell erhältliche humane Chondrozyten-Zelllinien einen Ausweg aus diesem Dilemma auf [Finger, 2003].

Neben der Auswahl des Untersuchungsmaterials kommt der Aufarbeitung des Probenmaterials eine hohe Bedeutung zu. Unsere Studien zur Relevanz der Cathepsine bei der OA führten wir ausschließlich mit High-density-Monolayer-Kulturen durch. Für die Chondrozyten-Monolayerkulturen wird der Knorpel steril freipräpariert. Der sequentielle, enzymatische Verdau findet durch Inkubation des feinst zerkleinerten Gewebes in Spinnerflaschen im CO₂-Begasungsbrutschrank zunächst mit Pronase E statt und wird mit bakterieller Collagenase P fortgesetzt [Küttner, 1982]. Somit werden die Zellen, dies ist belegt durch Literaturdaten, bereits während der Isolation aus dem Knorpel für viele Stunden mit

Matrix- und Kollagenfragmenten inkubiert und dadurch „aktiviert“ [Küttner, 1982]. Diese Problematik hätte durch die Verwendung von Knorpelstanzen als Untersuchungsmaterial umgangen werden können. Dieses Vorgehen war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht realisierbar. Zum einen erforderte die quantitative Bestimmung der Aktivität der Cathepsine mit dem selbst entwickelten Cathepsin-Assay Monolayerkulturen. Weiterhin konnten Untersuchungen zur Aufklärung der Signaltransduktion, Proteinnachweise mittels Western Blot, sinnvollerweise nur mit einheitlichen Zellpopulationen erfolgen. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Enzymaktivität versus mRNA-Expression) gewährleisten zu können, wurden die molekularbiologischen Untersuchungen deshalb ebenfalls an isolierten Chondrozyten durchgeführt. Lediglich die erneute Stimulation der Chondrozyten in der Zellkultur durch Gewebereste konnte vermieden werden. Die bei der Isolierung der Chondrozyten anfallenden Gewebereste konnten mit Hilfe eines Filtrationsschrittes von der Einzelzellsuspension abgetrennt werden.

Zusammenfassend belegen sowohl Literaturangaben als auch die in Rüttger et al. (2007) dargestellten Ergebnisse, dass bei weiterführenden Untersuchungen, die zeitnah zum Abschluss dieser Arbeit beginnen sollen, die Sammlung von humanen Normalknorpel und die Konzentration auf Explantatkulturen vorangetrieben werden muss.

4.3 Sowohl mRNA-Expression als auch Aktivität der Cathepsine B, K und L ist bei der Osteoarthritis erhöht

Die Aufklärung der Fähigkeit von Cathepsin K tripelhelikales Kollagen Typ II zu spalten, durch verschiedene Studien [Garnero, 1998; Atley, 2000; Hou, 2001] belegt, führte zu der Arbeitshypothese, dass an der Degradation der extrazellulären Matrix bei der Osteoarthritis neben proteolytischen Enzymen wie den Matrixmetalloproteinasen ebenfalls Cathepsine involviert sind. Da diese Aktivität bisher vorwiegend allgemein in Chondrozyten beschrieben wurde [Baici, 1995], wurde zur Überprüfung der genannten Hypothese ein Vergleich zwischen normalen und osteoarthrotisch veränderten Knorpelzellen angestellt.

Um die Beweisführung lückenlos zu gestalten, galt es zunächst die Proteinexpression der Cathepsine im humanen Knorpelgewebe nachzuweisen. Die Etablierung eines Nachweises der Cathepsine mittels Immunblot gestaltete sich nicht so trivial wie in der Literatur beschrieben [Friedrichs, 2003]. Eine Kombination der Verwendung von Bis-Tris-Gelen, dem Ersatz von BSA durch Soja als Blockierungslösung und die Anwendung von polyklonalen Antikörpern führten schließlich zum Cathepsin-Nachweis in Chondrozyten, der in Rüttger et al. (2006) dargestellt ist.

Trotz der bereits ausgeführten Schwierigkeiten, der geringen Größe der Kontrollkollektive und der Monolayer-Kultur, führten unsere Untersuchungen zu dem Schluss, dass die Expression der Cathepsine B, K und L bei der degenerativen Erkrankung Osteoarthritis

erhöht ist. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus der in Rüttger et al. (2007) gezeigten Analyse der Enzymaktivitäten. Die Bestätigung auf der Ebene der Transkription erfolgte durch die Analyse der mRNA-Expression mittels Real-time PCR.

Damit ist anzunehmen, dass die Expressionssteigerung der Cathepsine im Zusammenhang mit einer Degradation der extrazellulären Matrix bei der Osteoarthritis zu sehen ist. Dies wirft die Frage nach den Ursachen bzw. Auslösern dieser erhöhten Expression der Cathepsine in osteoarthrotischen Chondrozyten auf.

4.4 Natürliche und synthetisch hergestellte Kollagenfragmente wirken als Mediatoren einer erhöhten Expression der Cathepsine bei der Osteoarthritis

Die Analyse der Expression der Cysteinproteasen in normalen und OA-Chondrozyten erbrachte sowohl auf der Ebene der mRNA, der Proteine und der Aktivität eine erhöhte Expression der Cathepsine B, K und L bei der OA. Da Kollagenfragmente bei der Osteoarthritis im Endstadium bis zu 20% der Gesamtmasse an Kollagen ausmachen können [Billinghurst, 1997], stellten wir die Hypothese auf, dass Typ II Kollagenfragmente als Mediatoren der Gelenkdestruktion eine erhöhte Cathepsin B, K und L Expression induzieren können. Basierend auf dieser Hypothese wurden Effekte verschiedener Kollagenfragmente auf die Expression von Cathepsinen in artikulären Chondrozyten untersucht. Dazu wurden humane und bovine Chondrozyten mit verschiedenen Kollagenpräparationen, die durch Verdau mit bakterieller Kollagenase hergestellt wurden, behandelt: fragmentierte Gesamt-Kollagenmatrix aus Rinderknorpel (colf), sowie gereinigtes und fragmentiertes Typ II Kollagen (col2f). Die Herstellung und Verwendung dieser Kollagenpräparationen wurden bereits in der Literatur beschrieben [Fichter, 2006]. Zusätzlich wurde ein synthetisches 29-mer N-Telopeptid (Ntelo) aus der aminoterminalen Region des Typ II Kollagens eingesetzt, dessen Sequenz bereits beschrieben wurde [Jennings, 2003; Lucic, 2003; Fichter, 2006]. Alle drei Kollagenfragmente erhöhten die Cathepsin K- und L-Aktivität in Chondrozyten. Besonderes Augenmerk fiel in diesem Zusammenhang auf das N-Telopeptid. Unter dem Einfluss von Ntelo stieg die Cathepsin K Aktivität in normalen Chondrozyten um den Faktor 6 im Vergleich zu den unstimulierten normalen Chondrozyten. In OA-Chondrozyten, bei denen eine *in vivo* Stimulation durch Kollagenpeptide bereits vorausgesetzt werden kann, fiel die Aktivierung durch Ntelo geringer aus (2-fach). Auch eine Erhöhung der Cathepsin L-Aktivität durch Ntelo in Chondrozyten, insbesondere in normalen, konnte als signifikant gezeigt werden. Danach konnte gezeigt werden, dass dieser „Ntelo-Effekt“ dosisabhängig und sättigbar ist.

Diese Ergebnisse sprechen für die Bedeutung der Cathepsine und stellen neue Aspekte der Wirkungen von Kollagenfragmenten an humanen Chondrozyten dar und sind in Rüttger et al. (2007) ausführlich dargestellt. Die Expression der Cathepsine B, K und L wird demnach

unter Einfluss von Kollagenfragmenten stimuliert. Hingegen zeigen diese Kollagenfragmente keinen Einfluss auf die Expression von Cathepsin H.

Die nähere Charakterisierung der durch Kollagenfragmente, insbesondere das N-Telopeptid des Typ II Kollagen, hervorgerufene Auswirkungen erbrachte die Motivation zur Beschreibung der intrazellulären Signalweiterleitung nach Bindung der Fragmente an ihre(n) Rezeptor(en).

4.5 Die intrazelluläre Signalweiterleitung stromabwärts vom Annexin V beinhaltet den Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration, die Beteiligung von der Proteinkinase C (PKC) und der p38 MAPK

Die Tatsache, dass das synthetische N-Telopeptid vom Typ II Kollagen nachweislich an Annexin V (veraltet: Anchorin CII) bindet und den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle erhöht, bildete den Ausgangspunkt der Betrachtungen zur Signaltransduktion [Lucic, 2003; Zuscik, 2003]. Zunächst konnte ich zeigen, dass unter Verwendung von kalziumfreiem Medium es zu keiner Veränderung der Aktivität von Cathepsin K bei Stimulation mit dem N-Telopeptid kommt. Dies korreliert mit den o.g. Arbeiten von Lucic et al. zur Beteiligung des Kalziumkanals Annexin V bei der Ntelo-vermittelten Signaltransduktion. Abbildung 8 fasst die Ergebnisse zur Kalziumabhängigkeit des durch das N-Telopeptids des Typ II Kollagen ausgelösten Erhöhung der Cathepsin K-Aktivität in humanen Chondrozyten zusammen.

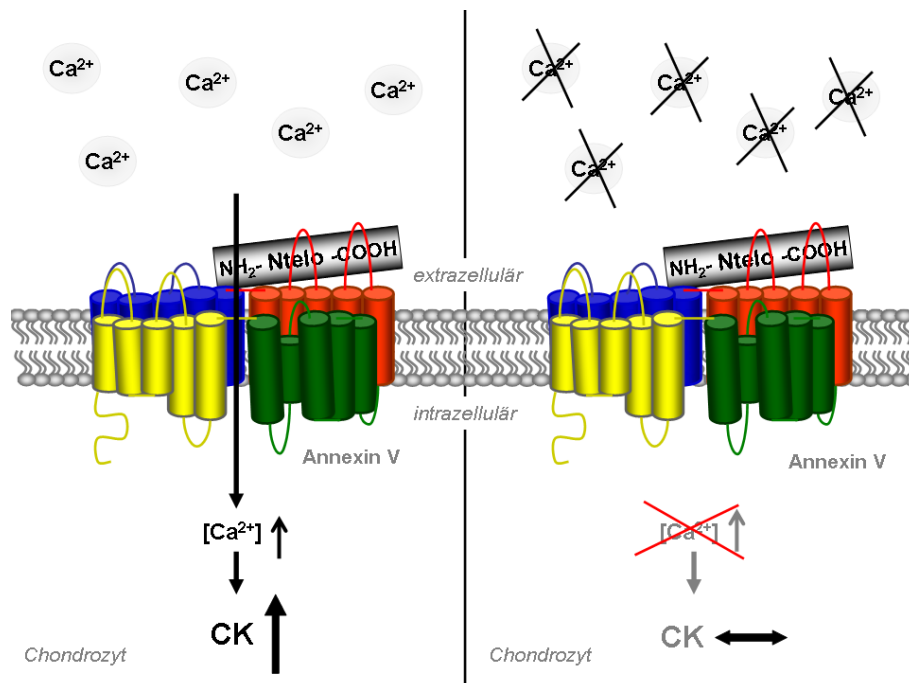


Abb. 8: Nachweis der Kalziumabhängigkeit des Ntelo-Effektes in Chondrozyten.

Die Stimulation mit dem N-Telopeptid von Typ II Kollagen (Ntelo) bewirkt eine über 4fache Erhöhung der Cathepsin K-Aktivität (CK) in OA-Chondrozyten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (beide Versuche wurden unter Verwendung von kalziumhaltigen Medium durchgeführt). Das Fehlen von Kalzium im Medium führt auch unter Ntelo-Stimulation zu keiner Veränderung der basalen Cathepsin K-Aktivität. Diese Untersuchung belegt indirekt die Beteiligung des Annexin V am geschilderten Effekt in Chondrozyten.

Angetrieben durch diese Ergebnisse erschien es plausibel, die Möglichkeit der Involvierung der Proteinkinase C in den Ntelo-vermittelten Signalweg zu untersuchen.

Die Stimulation mit dem N-Telopeptid führte zu einer Aktivierung (Phosphorylierung) der Proteinkinase C in humanen Chondrozyten. Die Inkubation von Chondrozyten mit dem intrazellulär wirksamen Aktivator der PKC Phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu) führte zu einer quantitativ vergleichbaren Aktivierung der Proteinkinase C und bereits nach einstündiger Inkubation auch zu einer Erhöhung der Aktivität der Cathepsine B, K und L. Dies legt die Beteiligung der Proteinkinase C an dem Effekt nahe. Dieser Befund steht im deutlichen Widerspruch zu einer Studie, die beschreibt, dass durch Annexin V die Proteinkinase C inhibiert wird [Dubois, 1998]. Deshalb führten wir weitere Arbeiten zur näheren Charakterisierung der Beteiligung der Proteinkinase C an der Ntelo-induzierten Erhöhung der Aktivitäten der Cathepsine durch. Dabei wurden mit Ntelo-stimulierte humane Chondrozyten in Ab- und Anwesenheit des pan PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimid I kultiviert. Die Inkubation mit Ntelo führte zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivität der Cathepsine B, K und L im Vergleich zur unstimulierten Referenz. Eine einstündige Präinkubation mit dem pan PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimide I reichte hingegen aus, um den Effekt zu unterbinden.

Alle beschriebenen Effekte konnten für Cathepsin H, einer ebenfalls lysosomalen Cysteinprotease, nicht konstatiert werden. Auf diese Diskrepanz wird später näher eingegangen.

Insgesamt legen diese Befunde nahe, dass der Ntelo-Effekt mit einer PKC-Aktivierung korreliert ist. Deshalb wurde der der Proteinkinase C nachgeschaltete Signalwege untersucht, um auf diese Weise eine Vorstellung des gesamten Signalweges zu bekommen. Zu diesem Zweck wurden humane Chondrozyten für 24 h mit und ohne das N-Telopeptid stimuliert. Die mRNA-Expression beider Versuchsansätze wurde mit dem RT² Profiler™ PCR Array Human MAP Kinase Signaling Pathway analysiert (siehe Abbildung A2), und es konnte gezeigt werden, dass die MAPK 13 (p38 delta) und MAPK 14 (p38 alpha) bei Stimulation mit Ntelo sehr stark hochreguliert werden. Diese Tatsache impliziert die Beteiligung der p38 MAPK bei der Ntelo-induzierten Erhöhung der Expression der Cathepsine in Chondrozyten.

Damit geben die in *Rüttger et al. (2007)* gezeigten Resultate einen ersten Überblick über N-Telopeptid-initiierte Signalwege in humanen Chondrozyten und postulieren die Beteiligung der Proteinkinase C und der p38 MAPK. Die Ergebnisse der erstmaligen Betrachtung der durch das N-Telopeptid des Typ II Kollagens ausgelöste Signaltransduktionswege sind in Abbildung 9 zusammengefasst.

Unterstützt werden die Daten durch punktuelle Untersuchungen auf der Ebene der Proteinsynthese. Wir dokumentierten unter dem Einfluss des N-Telopeptides des Typ II Kollagen eine gesteigerte Sezernierung der Procathepsine B, K und L ins Kulturmedium durch Chondrozyten.

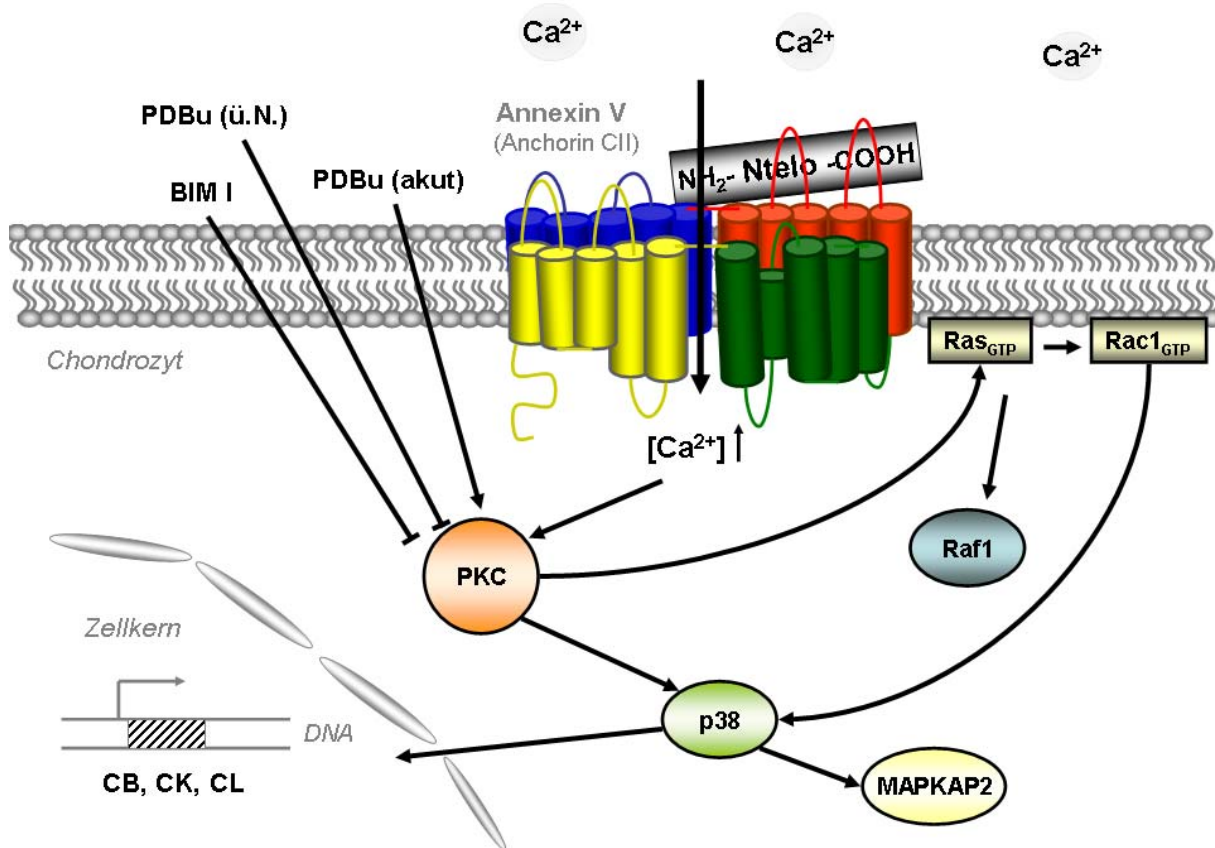


Abb.9: Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungen zur Signalweiterleitung am chondrozytenspezifischen Kollagenrezeptor Annexin V.

Die systematische Analyse des Signalweges postuliert, dass eine Stimulation von Chondrozyten mit dem N-Telopeptid des Typ II Kollagen zunächst zu einer kalziumabhängigen Aktivierung der Proteinkinase C führt. Weiter stromabwärts zeichnet eine Aktivierung des p38-Weges für die erhöhte mRNA-Expression der Transkripte für Cathepsin B, Cathepsin K und Cathepsin L verantwortlich.

Somit konnte der Ntelo-Effekt sowohl auf der Ebene der Transkription und Translation als auch der Enzymaktivität aufgezeigt werden. Damit gelang es erstmals die Relevanz der Cathepsine beim degenerativen Knorpelabbau bei der OA umfassender zu charakterisieren.

4.6 Diskrepanz in der Regulation von Cathepsin H versus Cathepsin B, K und L

Wie bereits erwähnt konnten die dargestellten Zusammenhänge, in Bezug auf den aktivierenden Einfluss der Kollagenfragmente insbesondere des N-Telopeptides des Typ II Kollagens auf die Expression der Cathepsine, für Cathepsin H nicht konstatiert werden. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, warum die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin H sich anders als B, K und L verhält. Die beschriebene differente chromosomale Lokalisation der Cathepsine impliziert dabei nicht automatisch das Nutzen von unterschiedlichen Promotoren [Kirschke, 1998]. Die derzeitige Literaturlage, u.a. die Arbeit von Katunuma et al. zur differentiellen Verteilung der Cathepsine in der Zelle (CB, CK und CL: perinukleär; CH: nahe der Zellmembran) [Katunuma, 1995], offenbart keinen schlüssigen Ansatz zur

Interpretation des Verhaltens von Cathepsin H. Für die Klärung der Tatsache, dass die Cathepsine B, K und L als typische Vertreter von Endopeptidasen durch Kollagenfragmente beeinflussbar sind, dieser Effekt aber bei der einzigsten lysosomalen Aminopeptidase Cathepsin H unterbleibt sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.7 Diskrepanz zwischen Klinik und Hypothese – ein Fallbericht

Erkrankungen der großen Gelenke, zu denen die Osteoarthritis zählt, sind sehr häufig und zeigen eine deutliche Altersabhängigkeit. Berücksichtigt man den frühzeitigen Beginn von degenerativen Veränderungen der Gelenke, so erstaunt es nicht, dass dies in der Literatur jenseits des 40. Lebensjahrs als völlig normal eingestuft wird [Niethard, 2003]. Als sehr unterschiedlich wird dagegen das Schmerzempfinden der Patienten beschrieben [Niethard, 2003; Duncan, 2007].

In Müller et al. (2007) berichten wir über eine Patientin, die seit mehreren Jahren unter persistierenden und therapieresistenten Knieschmerzen litt und infolge dessen eine Knie-Totalendoprothese erhielt. Das klinische Beschwerdebild korrelierte jedoch nicht mit den röntgenologisch erhobenen Daten. Die routinemäßig angefertigten Röntgenbilder in antero-posteriorer Projektion unter Belastung und im seitlichen Strahlengang ergaben diskrete Zeichen einer typischen Gonarthrose mit beginnenden osteophytären Anbauten und eine bestehende Retropatellararthrose im rechten Knie. Ohne die starken klinischen Beschwerden wäre die Implantation der Endoprothese nicht indiziert gewesen. Im Lichte der uns interessierenden Kausalität muss aber festgestellt werden, dass eine besonders auffällige Destruktion des Gelenks nicht vorlag. Die Patientin fiel im Rahmen der Studie zur Klärung der Relevanz der Cathepsine bei der OA auf, in die insgesamt 31 Gonarthrose-Patienten involviert waren. Interessanterweise ergaben unsere Untersuchungen der Cathepsin-Expression in den Chondrozyten der erwähnten Patientin eine im Vergleich zum gesamten Patientenkollektiv signifikant erhöhte Expression der Cathepsine B, K und L sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf der Ebene der Enzymaktivitäten. Außerdem lag bei dieser Patientin die mRNA-Expression von Cystatin C, dem endogenen Cathepsininhibitor, im nicht messbaren Bereich bei der Real-Time PCR. Aufgrund dieser ungewöhnlichen Ergebnisse hätten wir bei der Patientin einen überdurchschnittlichen Knorpelverlust erwartet, wenn den Cathepsinen eine alleinige Rolle beim Knorpelabbau zukäme. Diese auffälligen Ergebnisse legten es nahe, eine genetische Ursache dieser Besonderheit anzunehmen. Deshalb untersuchten wir das Expressionsprofil dieser Proteine auch noch in Lymphozyten dieser Patientin. Hier ergaben sich jedoch im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe keinerlei Unterschiede. Dieses Resultat in Verbindung mit einer parallel vom Institut für Humangenetik der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Direktor: Prof.

Dr. med. Uwe Claussen) angefertigten Chromosomenanalyse ergaben auch keinen Hinweis auf eine genetische Aberration.

Zusammenfassend relativiert dieser Fallbericht die postulierte bedeutende Rolle der Cysteinproteasen für die Knorpeldegradation. Allerdings muss auch die Zeitschiene der Entwicklung der degenerativen Veränderungen in Betracht gezogen werden, die in einem Momentbild nicht berücksichtigt. Weiterhin könnten für diese Erhöhung der Expression der Cathepsine ein akuter entzündlicher Schub oder eine akute Erhöhung von Kollagenfragmenten (u.a. von Ntelo) zugrunde liegen. Deshalb ist es durchaus legitim, Enzyme der Knorpeldegradation wie MMPs und Cysteinproteasen in zunehmendem Maß als Targets für die Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen anzusehen. Der vorliegende Fall zeigt aber deutlich, dass die Cysteinproteasen auf keinen Fall die alleinigen Ziele einer derartigen Inhibitortherapie sein können.

4.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Cathepsine, insbesondere die Cathepsine K und L, sind vielversprechende Targets bei der Behandlung degenerativer Gelenkerkrankungen. Ein umfassendes Verständnis der Wirkweise dieser Cysteinproteasen ist jedoch eine entscheidende Voraussetzung, um dieses Potential nutzen zu können. In der vorliegenden Dissertation wurde deshalb die Relevanz der Cathepsine bei der OA systematisch untersucht. Ein aktivierender Einfluss von Kollagenfragmenten auf die Expression der Cathepsine in Chondrozyten konnte aufgezeigt werden. Die bisher ungeklärte intrazelluläre Signalweiterleitung stromabwärts des Kollagenrezeptors Annexin V konnte beschrieben werden. Diese Arbeit trägt deshalb nicht nur zu einem umfassenderen Verständnis der Rolle der Cathepsine bei der OA bei, sondern bereitet durch die Erkenntnisse zur Signaltransduktion, auch die Basis für eine mögliche therapeutische Intervention.

5 Zusammenfassung

Die Osteoarthritis ist eine degenerative Gelenkerkrankung, deren Ursachen bisher nur ansatzweise bekannt und verstanden sind. Von zentraler Bedeutung im Krankheitsgeschehen der Osteoarthritis ist die fortschreitende Zerstörung des Gelenkknorpels durch proteolytische Enzyme. Bisherige Studien beschäftigten sich vorwiegend mit den Matrix-Metalloproteinasen. Eine Beteiligung der Cysteinproteasen wurde nicht systematisch untersucht. Von einem näheren Verständnis der degenerativen Prozesse, unter Mitwirkung proteolytischer Enzyme, erhofft man sich neue Ansatzmöglichkeiten für eine therapeutische Einflussnahme.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Bedeutung der Aktivität der Cathepsine bei der Osteoarthritis näher charakterisiert. Hierzu war die Etablierung eines Fluoreszenzassays (Cathepsin-Assay) im Mikrotiterplattenformat unternommen worden, der es erlaubt die Enzymaktivität in vitalen, nicht-fixierten Zellen quantitativ darzustellen. Durch Versuche mit Cathepsin-*knockout*-Makrophagen konnte die Spezifität der Methode belegt werden. Mit dieser Methode gelang der Nachweis, dass die Expression der Cathepsine B, K und L bei der Osteoarthritis signifikant erhöht ist.

Der Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war es, natürlich vorkommende Kollagenfragmente als mögliche Ursache einer erhöhten Cathepsin-Expression zu studieren. Vergleichende Stimulationsstudien mit bei der Osteoarthritis verstärkt gebildeten Kollagenfragmenten (Kollagenmischfragmente: colf; Typ II Kollagen – Fragmente: col2f; synthetisches N-Telopeptid von Typ II Kollagen: Ntelo) identifizierten diese als Aktivatoren der Expression der Cathepsine in humanen Chondrozyten. Die nähere Charakterisierung des induktiven Effektes auf die Expression der Cathepsine konnte für das N-Telopeptid als konzentrationsabhängig und sättigbar bestätigt werden. Darüber hinaus konnte, hervorgerufen durch Stimulation mit Ntelo, eine verstärkte Sezernierung der Procathepsine B, K und L ins Kulturmedium der Chondrozyten ermittelt werden.

Die bereits in der Literatur beschriebene Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch die Bindung des N-Telopeptids an Annexin V (Anchorin CII) veranlassten zur Untersuchung der nachgeschalteten Signalwege. Durch den Nachweis der Kalziumabhängigkeit, einer Phosphorylierung / Aktivierung der Proteinkinase C und der Involvierung der p38 MAPK gelang es erstmals einen durch Kollagenfragmente aktivierten Signalweg detailliert zu beschreiben, der zur Erhöhung der Expression der Cathepsine in Chondrozyten führt.

6 Summary

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease, whose complete healing is still a great challenge. Progressive degradation of articular cartilage by proteolytic enzymes is a prominent feature of OA. Matrix metalloproteinases (MMPs) have been in the focus of most of the protease-related studies. The participation of cysteine proteinases in this process is only marginally studied. But pH values as low as 5.5 have been reported for diseased cartilage, thus providing a pH environment optimal for the potential participation of cathepsins in matrix degradation in OA. To study the importance of cysteine proteinases in OA a fluorescence assay was established allowing selective determination of cathepsin B, H, K and L activity in live cells. The method was validated by using cathepsin *knockout* macrophages. Based on utilising this assay we found osteoarthritic processes to be accompanied by an up-regulation of cathepsin B, K and L activity. In addition, an increased expression of cathepsin B, K and L mRNA expression was detected by real time PCR.

To address the role of collagen fragments in up-regulation of cathepsin expression chondrocytes were incubated in presence of different collagen fragments (col1: collagen fragments, col2f: collagen type II fragments, Ntelo: synthetic N-telopeptide of type II collagen). The work demonstrates that collagen degradation products may amplify and preserve the erosive process in OA by stimulating the expression of the cathepsins B, K and L. The most prominent stimulation was observed with Ntelo. Moreover, secretion of procathepsins B, K and L from chondrocytes, which were stimulated with varying concentrations of the Ntelo, suggested that these enzymes potentially contribute to cartilage matrix degradation. However, it should be emphasized that cathepsin H does not follow the regulation of the other three cathepsins.

One of the issues to underscore is that the knowledge of the signal cascade triggered by these proteolytic fragments is important since therapeutic interventions may eventually interrupt this cascade. Therefore, a further aim was to explore the signal transduction pathway leading to an enhanced synthesis, activation and secretion of the cathepsins B, K and L under the influence of Ntelo. The study was focussed on the processes downstream of the calcium channel Annexin V which acts as receptor for Ntelo. Taken together, the present data suggest the dependence of calcium and the involvement of PKC and p38 MAPK. But a closer examination of the signal cascade has to be done in the future.

Based on the assumed role of the collagen fragments in up-regulation of cathepsin B, K and L expression the work may provide new clues for the development of treatments aimed at preventing cartilage degradation on OA.

7 Literaturverzeichnis

- Abrahamson M.** (1994). "Cystatins." *Methods Enzymol.* 244: 685-700.
- Ahmed N.,** Martin, LA., Watts, LM., Palmer, J., Thornburg, L., Prior, J., Esser, RE. (1992). "Peptidyl Fluoromethyl Ketones as Inhibitors of Cathepsin B." *Biochem. Pharmacol.* 44 (6): 1201-1207.
- Aisa M.C.,** R. S., Senin U., Maggio D, Russell RG. (1996). "Cathepsin B activity in normal human osteoblast-like cells and human osteoblastic osteosarcoma cells (MG-63): regulation by interleukin-1 beta and parathyroid hormone." *Biochim Biophys Acta* 1290(1): 29-36.
- Ali S.,** Evans, L., Stainthorpe, E., Lack, C.H. (1967). "Characterization of Cathepsins in Cartilage." *Biochem. J.* 105: 549-557.
- Angliker H.,** Wikstrom P., Kirschke, H., Shaw, E. (1989). "The inactivation of the cysteinyl exopeptidases cathepsin H and C by affinity-labelling reagents." *Biochem. J.* 262: 63-68.
- Assfalg-Machleidt I.,** Rothe, G., Klingel, S., Banati, R., Mangel, W.F., Valet, G., Machleidt, W. (1992). "Membrane Permeable Fluorogenic Rhodamine Substrates for Selective Determination of Cathepsin L." *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373: 433 - 440.
- Atley L.M.,** M. J., Lalumiere M, Eyre DR. (2000). "Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: characterization of the cleavage sites generating by cross-linked N-telopeptide neoepitope." *Bone* 26(3): 241-7.
- Aurich M.,** P. A., Reiner A, Mollenhauer C, Margulis A, Kuettner KE, Cole AA (2002). "Matrix homeostasis in aging normal human ankle cartilage." *Arthritis Rheum.* 46(11): 2903-10.
- Avitzour M.,** D. R., Raboy B, Askari N, Engelberg D, Livnah O (2007). "Intrinsically active variants of all human p38 isoforms." *FEBS J.*
- Baici A.,** Hörler, D., Lang, A., Merlin, C., and Kissling, R. (1995). "Cathepsin B in osteoarthritis: zonal variation of enzyme activity in human femoral head cartilage." *Annals of the Rheumatic Diseases* 54: 281 - 288.
- Baici A.,** Lang, A. (1990). "Effect of interleukin - 1 β on the production of cathepsin B by rabbit articular chondrocytes." *FEBS Letters* 277: 93-96.
- Baici A.,** Lang, A. (1990). "Cathepsin B secretion by rabbit articular chondrocytes: modulation by cycloheximide and glycosaminoglycans." *Cell Tissue Res* 259: 567-573.
- Baici A.,** Lang, A., Hörler, D., Kissling, R., and Merlin, C. (1995). "Cathepsin B in osteoarthritis: cytochemical and histochemical analysis of human femoral head cartilage." *Annals of the Rheumatic Diseases* 54: 289 - 297.
- Baici A.,** Lang, A., Hörler, D., Knöpfel, M. (1988). "Cathepsin B as a maker of the dedifferentiated chondrocyte phenotype." *Ann. Rheum. Dis.* 47: 684-691.
- Bailey A.** (2000). "Perspective article: the fate of collagen implants in tissue defects." *Wound Repair Regen.* 8(1): 5-12.

- Barrett A.**, Rawlings ND, Woessner JF (1998). "Handbook of Proteolytic Enzymes" Academic Press, London.
- Barrett A.** (2000). "Peptidases." Current Protocols in Protein Science. Supplement 21.
- Barrett A.**, Rawlings, ND., Davies, ME., Machleidt, W., Salvesen, G., Turk, V. (1986). "Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. Proteinase Inhibitors." Proteinase Inhibitors: 515-569.
- Bayliss M. T.**, and Ali, S.Y. (1978). "Studies on Cathepsin B in Human Articular." Biochem. J. 171: 149-154.
- Belkhiri A.**, Lytvyn, V., Guilbault, C., Bourget, L., Massie, B., Nägler, DK., Menard, R. (2002). "A noninvasive cell-based assay for monitoring proteolytic activity within a specific subcellular compartment." Analytical Biochemistry 306: 37-246.
- Berardi S.**, L. A., Kostoulas G, Horler D, Vilei EM, Baici A. (2001). "Alternative messenger RNA splicing and enzyme forms of cathepsin B in human osteoarthritic cartilage and cultured chondrocytes." Arthritis Rheum. 44(8): 1819-31.
- Berger A.**, Schechter I. (1970). "Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 257(813):249-64.
- Billinghurst R.C.**, D. L., Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H, Poole AR. (1997). "Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage." J Clin Invest. 199(7): 1534-45.
- Billinghurst R.C.**, W. W., Ionescu M, Reiner A, Dahlberg L, Chen J, van Wart H, Poole AR (2000). "Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase." Arthritis Rheum. 43(3): 664-72.
- Blum G.**, M. S., Keren K, Fonovic M, Jedeszko C, Rice MJ, Sloane BF, Bogyo M. (2005). "Dynamic imaging of protease activity with fluorescently quenched activity-based probes." Nat Chem Biol. 1(4): 203-9.
- Böhm K.**, C. M., Afentakis A, Müller M, Nöthen M (2006). Gesundheit-Ausgaben, Krankheitskosten und Personal 2004.
- Boonacker E.**, and Van Noorden, C.J.F. (2001). "Enzyme Cytochemical Techniques for Metabolic Mapping in Living Cells, with Special Reference to Proteolysis." Cartilage Histochem. Cytochem. J. 49(12): 1473-1486.
- Bossard M.J.**, T. T., Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA. (1996). "Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification." J Biol Chem. 271(21): 12517-24.
- Boudreau N.J.**, J. P. (1999). "Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come." Biochem J. 339: 481-8.

- Broad L.M.**, C. T., Short AD, Taylor CW (1999). "Receptors linked to polyphosphoinositide hydrolysis stimulate Ca^{2+} extrusion by a phospholipase C-independent mechanism." *Biochem J.* 342(1): 199-206.
- Bromme D.** (2000). "Peptidases." *Current Protocols in Protein Science.* Supplement 21.
- Bromme D.**, Bonneau, P.R., Lachance, P., and Storer, A.C. (1994). "Engineering the S2 subsite specificity of human cathepsin S to a cathepsin L- and cathepsin B-like specificity." *J. Biol. Chem.* 269: 30238 - 30242.
- Bromme D.**, K. J., Okamoto K, Rasnick D, and Palmer JT (1996). "Peptidyl vinyl sulphones: A new class of potent and selective cysteine protease inhibitors. S2P2 specificity of human cathepsin O2 in comparison with cathepsin S and L." *Biochem. J.* 315: 85 - 89.
- Bromme D.**, and Okamoto K. (1995). "Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution." *Biol Chem Hoppe Seyler.* 376(6): 379-84.
- Brune K.**, A. U., Peskar BA. (1984). "Pharmacological control of leukotriene and prostaglandin production from mouse peritoneal macrophages." *Agents Actions* 14(5-6): 729-34.
- Buttle D.J.**, Murata, M., Knight, C.G., Barrett, A.J. (1992). "CA074 methyl ester: a proinhibitor for intracellular cathepsin B." *Arch. Biochem. Biophys.* 299: 377-380.
- Carmona E.**, Dufour, É., Plouffe, C., Takebe, S., Mason, P., Mort, J.S., and Menard, R. (1996). "Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases." *Biochemistry* 35: 8149 - 8157.
- Carragher N.O.**, L. B., Ross R, Raines EW. (1999). "Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlates with cleavage of pp125(FAK), paxillin, and talin." *J Cell Biol.* 147(3): 619-30.
- Castagna M.**, T. Y., Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. (1982). "Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters." *J Biol Chem.* 257(13): 7847-51.
- Chikazu D.**, H. Y., Ogata N, Nemoto K, Itabashi A, Takato T, Kumegawa M, Nakamura K, Kawaguchi H. (2000). "Fibroblast growth factor (FGF)-2 directly stimulates mature osteoclast function through activation of FGF receptor 1 and p42/p44 MAP kinase." *J Biol Chem.* 275(40): 31444-50.
- Coussens L.**, Fingleton, B., Matrisian, LM. (2002). "Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer: Trials and Tribulation." *Science* 295: 2387-2392.
- Coussens L.**, R. L., Parker PJ, Ullrich A (1987). "Alternative splicing increases the diversity of the human protein kinase C family." *DNA* 6(5): 389-94.
- D'andrea P.**, C. A., Grandolfo M. (1998). "Intercellular calcium signalling between chondrocytes and synovial cells in co-culture." *Biochem J.* 329: 681-7.
- Davidson R.K.**, W. J., Kevorkian L, Darrah C, Cooper A (2006). "Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage." *Arthritis Res Ther.* 8(4): R124.

- De Ceuninck F.**, P. S., Pagano M, Tsagris L, Blanchard O, Willeput J, Corvol M. (1995). "Inhibition of chondrocyte cathepsin B and L activities by insulin-like growth factor-II (IGF-II) and its Ser29 variant in vitro: possible role of the mannose 6-phosphate/IGF-II receptor." *Mol Cell Endocrinol.* 113(2): 205-13.
- De Melker A.**, Sonnenberg A. (1999). "Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events." *Bioessays* 21(6):499-509.
- Delaisse J.-M.**, Ledent, P., and Vaes, G. (1991). "Collagenolytic cysteine proteinases of bone tissue." *Biochem. J.* 279: 167-174.
- Deutsche Gesellschaft für Orthopädie** (2002). Leitlinien der Orthopädie. Köln, Dt. Ärzte-Verlag. 2. Auflage.
- Dodds R.A.**, C. J., Drake FH, Gowen M. (1999). "Expression of cathepsin K messenger RNA in giant cells and their precursors in human osteoarthritic synovial tissues." *Arthritis Rheum.* 42(8): 1588-93.
- Dolbeare F. A.**, and Smith, R.E. (1977). "Flow cytometric measurement of Peptidases with use of 5-nitro-salicylaldehyde and 4-methoxy-beta-naphthylamine derivatives." *Clin. Chem.* 23: 1485-1491.
- Dolbeare F. A.**, and Vanderlaan, M. (1979). "A Fluorescent Assay of Proteinases in Cultured Mammalian Cells." *Histochem. Cytochem. J.* 27(11): 1493-1495.
- Drake F.H.**, D. R., James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G, Gowen M. (1996). "Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts." *J Biol Chem.* 271(21): 12511-6.
- Dubois T.**, M. J., Feliars D, Solito E, Russo-Marie F, Oudinet JP (1998). "Annexin V inhibits protein kinase C activity via a mechanism of phospholipid sequestration." *Biochem. J.* 330: 1277-1282.
- Dubois T.**, O. J., Mira JP, Russo-Marie F. (1996). "Annexins and protein kinases C." *Biochim Biophys Acta* 1313(3): 290-4.
- Duncan R.**, Peat G, Thomas E, Hay E, McCall I, Croft P (2007) "Symptoms and radiographic osteoarthritis: not as discordant as they are made out to be?" *Ann Rheum Dis.* 66(1):86-91.
- Dunn B. M.** (2000). "Peptidases." *Current Protocols in Protein Science Supplement* 21.
- Durr J.**, G. S., Potocnik A, von der Mark H, von der Mark K (1993). "Localization of beta 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin." *Exp Cell Res.* 207(2): 235-44.
- Enomoto M.**, L. P., Menko AS, Boettiger D (1993). "Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin." *Exp Cell Res.* 205(2): 276-85.
- Eyre D.R.** (1991). "The collagens of articular cartilage." *Semin Arthritis Rheum.* 21(3 Suppl 2): 2-11.

- Eyre D.R.**, W. J., Apone S. (1987). "A growing family of collagens in articular cartilage: identification of 5 genetically distinct types." *J Rheumatol.* 14: 25-7.
- Felbor U.**, D. L., Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR, Mothes W. (2000). "Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII." *EMBO J.* 19(6): 1187-94.
- Fichter M.**, K. U., Schomburg J, Jennings L, Cole AA, Mollenhauer J. (2006). "Collagen degradation products modulate matrix metalloproteinase expression in cultured articular chondrocytes." *J Orthop Res.* 24(1): 63-70.
- Finger F.**, Schorle C, Zien A, Gebhard P, Goldring MB, Aigner T (2003) "Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2." *Arthritis Rheum.* 48(12): 3395-403.
- Foghsgaard L.**, Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., Jäättelä, M. (2001). "Cathepsin B Acts as a Dominant Execution Protease in Tumor Cell Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor." *The Journal of Cell Biology* 153(5).
- Fratzl-Zelman N.**, V. A., Roschger P, Nader A, Gelb BD, Fratzl P, Klaushofer K. (2004). "Decreased bone turnover and deterioration of bone structure in two cases of pycnodysostosis." *J Clin Endocrinol Metab.* 89(4): 1538-47.
- Freshney N.W.**, R. L., Guesdon F Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J (1994). "Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27." *Cell* 78(6): 1039-49.
- Friedrichs B.**, T. C., Reinheckel T, Deussing J, von Figura K, Herzog V, Peters C, Saftig P, Brix K. (2003). "Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L." *J Clin Invest.* 111(11): 1733-45.
- Gadher S.J.**, E. D., Wotton SF, Schmid TM, Woolley DE. (1990). "Degradation of cartilage collagens type II, IX, X and XI by enzymes derived from human articular chondrocytes." *Matrix.* 10(3): 154-63.
- Garnero P.**, Borel, O., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Drake, F.H., McQueney, M.S., Foged, N.T., Delmas, P.D., and Delaisse J-M. (1998). "The Collagenolytic Activity of Cathepsin K Is Unique among Mammalian Proteinases." *The Journal of Biological Chemistry* 273(48): 32347-32352.
- Gekeler V.**, B. R., Uberall F, Ise W, Schubert C, Utz I, Hofmann J, Sanders KH, Schachtele C, Klemm K, Grunicke H (1996). "Effects of the selective bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitor GF 109203X on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance." *Br J Cancer* 74(6): 897-905.
- Gelb B.D.**, S. G., Heller M, Weremowicz S, Morton C, Desnick RJ, Chapman HA. (1997). "Structure and chromosomal assignment of the human cathepsin K gene." *Genomics* 41(2): 258-62.
- Gelb B.D.**, Shi, G.P., Chapman, H.A., Desnick, R.J. (1996). "Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency." *Science* 273: 1236-1238.
- Gerke V.**, Moss SE (1992) "Annexins: From Structure to Function" *Physiol Rev* 82:331-371.
- Giancotti F.G.**, R. E. (1999). "Integrin signaling." *Science* 285(5430): 1028-32.

- Goessler U.R.**, B. P., Bieback K, Huber K, Fleischer LI, Hormann K, Riedel F (2005). "Differential modulation of integrin expression in chondrocytes during expansion for tissue engineering." *In vivo* 19(3): 501-7.
- Gowen M.**, L. F., Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavaría M, Bertoncello I, Drake F, Zavarisek S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C, Kola I (1999). "Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization." *J Bone Miner Res.* 14(10): 1654-63.
- Grigolo B.**, R. L., Fiorini M, Piacentini A, De Franceschi L, Facchini A. (2003). "Cathepsin B as a soluble marker to monitor the phenotypic stability of engineered cartilage." *Biomaterials.* 24(10): 1751-7.
- Guicciardi M.E.**, D. J., Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, Kaufmann SH, Gores GJ (2000). "Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c." *J Clin Invest.* 106(9): 1127-37.
- Halangk W.**, L. M., Brandt-Nedelew B, Roth W, Ruthenberger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussin J (2000). "Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis." *J Clin Invest.* 106(6): 773-81.
- Hansen T.**, P. P., Gaumann A, Keyszer GM, Eysel P, Eckardt A, Brauer R, Kriegsmann J. (2000). "Cathepsin B and its endogenous inhibitor cystatin C in rheumatoid arthritis synovium." *J Rheumatol.* 27(4): 859-65.
- Hansen T.**, U. R., Gaumann A, Hundorf I, Maurer J, Kirkpatrick CJ, Kriegsmann J. (2001). "Expression of matrix-degrading cysteine proteinase cathepsin K in cholesteatoma." *Mod Pathol.* 14(12): 1226-31.
- Hashimoto Y.**, K. H., Narita Y, Hachiya Y, Hayakawa T, Kos J, Turk V, Katunuma N. (2001). "Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis." *Biochem Biophys Res Commun.* 283(2): 334-9.
- Hegen M.**, G. M., Nickerson-Nutter CL, Lin LL, Telliez JB (2006). "MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis." *J Immunol.* 177(3): 1913-7.
- Hockberger P.**, T. M., Swandulla D, Lux HD (1989). "A diacylglycerol analogue reduces neuronal calcium currents independently of protein kinase C activation." *Nature* 338(6213): 340-2.
- Hollander A.P.**, P. I., Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR. (1995). "Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration." *J Clin Invest.* 96(6): 2859-69.
- Homandberg G.A.**, C. V., Wen C (2002). "Fibronectin fragments active in chondrocytic chondrolysis can be chemically cross-linked to the alpha5 integrin receptor subunit." *Osteoarthritis Cartilage* 10(12): 938-49.

- Honorati M.C.**, C. L., Facchini A. (2004). "IL-17, IL-1beta and TNF-alpha stimulate VEGF production by dedifferentiated chondrocytes." *Osteoarthritis Cartilage* 12(9): 683-91.
- Horton W.** (1993). *Morphology of Connective Tissue: Cartilage*, Wiley-Liss, Inc.
- Hou W.**, Li, Z., Gordon, R.E., Chan, K., Klein, M.J., Levy, R., Keysser, M., Keyszer, G., and Brömme, D. (2001). "Cathepsin K Is a Critical Protease in Synovial Fibroblast-Mediated Collagen Degradation." *American Journal of Pathology* 159(6): 2167-2177.
- Hou W.**, L. W., Keyszer G, Weber E, Levy R, Klein MJ, Gravallesse EM, Goldring SR, Bromme D. (2002). "Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium." *Arthritis Rheum.* 46(3): 663-74.
- Huber R.**, R. J., Paques EP (1990). "The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes." *EMBO J.* 9(12): 3867-74.
- Hulkower K.**, Butler, CC., Linebaugh, BE., Klaus, JL., Keppler, D., Giranda, VL., Sloane BF. (2000). "Fluorescent microplate assay for cancer cell-associated cathepsin B." *Eur. J. Biochem.* 267: 4165-4170.
- Hynes R.** (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." *Cell* 69(1): 11-25.
- Hynes R.** (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell.* 110 (6):673-87.
- Ikeda Y.**, I. T., Mishiro T, Nakano S, Ikebe M, Yasuoka S. (2000). "Cathepsins B and L in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and the effect of cathepsin B on the activation of pro-urokinase." *J Med Invest.* 47(1-2): 61-75.
- Jean D.**, G. N., Frade R. (2002). "Characterization of human cathepsin L promoter and identification of binding sites for NF-Y, Sp1 and Sp3 that are essential for its activity." *Biochem J.* 361: 173-84.
- Jeannot V.**, S. J., Deumie M, Viallet P. (1997). "Intracellular accumulation of rhodamine 110 in single living cells." *J Histochem Cytochem.* 45(3): 403-12.
- Jennings L.**, W. L., King KB, Hammerle H, Cs-Szabo G, Mollenhauer J. (2001). "The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes." *Connect Tissue Res.* 42(1): 71-86.
- Kafienah W.**, Brömme, D., Buttle, D.J., Croucher, L.J., and Hollander, A.P. (1998). "Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix." *Biochem. J.* 331: 727-732.

- Karsdal M.A.**, H. P., Henriksen K, Kirkegaard T, Nielsen KL, Lou H, Delaisse JM, Foged NT. (2003). "Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38 MAPK and regulation of RANK expression." *J Biol Chem.* 278(45): 44975-87.
- Katunuma N**, Kominami E (1985) Lysosomal thiol cathepsins and their endogenous inhibitors. Distribution and localization. *Prog Clin Biol Res* 180:71-9.
- Katunuma N.**, Tsuge, H., Nukatsuka, M., Asao, T., Fukushima, M. (2002). "Structure-based Design of Specific Cathepsin Inhibitors and Their Application to Protection of Bone Metastases of Cancer Cells." *Arch. Biochem. Biophys.* 397(2): 305-311.
- Keyszer G.**, Redlich, A., Häupl, T., Zacher, J., Sparmann, M., Ungethüm, U., Gay, S., Burmester GR. (1998). "Differential Expression of Cathepsins B and L compared with Matrix Metalloproteinases and their respective Inhibitors in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis: A Parallel Investigation by semiquantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry." *Arthritis Rheum.* 41(8): 1378-1387.
- Kirsch T.**, P. M. (1992). "Selective binding of anchorin CII (annexin V) to type II and X collagen and to chondrocalcin (C-propeptide of type II collagen). Implications for anchoring function between matrix vesicles and matrix proteins." *FEBS Lett.* 310(2): 143-7.
- Kirschke H. B.**, A.J. / Rawlings, N.D. (Hgg.) (1998). "Lysosomal Cysteine Proteinases."
- Knudson W.**, Loeser RF (2002) „CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis“ *Cell Mol Life Sci* 59:36-44.
- Kobayashi M.**, S. T., Feige U, Poole AR (2003). "A synthetic peptide of type II collagen up-regulates gene expression of collagenases and proinflammatory cytokines via MAPKinase pathways in normal human chondrocytes." *Trans Orthop Res Soc.* 28(577).
- Komuro H.**, O. T., Kuhn K, Quach J, Brinson DC, Shikhman A, Valbracht J, Creighton-Achermann L, Lotz M. (2001). "The osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappaB/receptor activator of nuclear factor kappaB ligand system in cartilage." *Arthritis Rheum.* 44(12): 2768-76.
- König A.**, K. S. (2003). "Langzeitergebnisse in der Knieendoprothetik." *Orthopäde* (32): 516-526.
- Konttinen Y.T.**, M. J., Li TF, Salo J, Lassus J, Liljestrom M, Hukkanen M, Takagi M, Virtanen I, Santavirta S. (2002). "Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis." *Arthritis Rheum.* 46(4): 953-60.
- Konttinen Y.T.**, M. J., Ruuttila P, Hukkanen M, Santavirta S. (2005). "Chondrocyte-mediated collagenolysis correlates with cartilage destruction grades in osteoarthritis." *Clin Exp Rheumatol.* 23(1): 19-26.

- Krauss G.** (2003). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, WILEY-VCH GmbH.
- Kurtis M.S.**, T. B., Gaza OA, Mollenhauer J, Knudson W, Loeser RF, Knudson CB, Sah R (2001). "Mechanisms of chondrocyte adhesion to cartilage: role of β 1-integrins, CD44, and annexin V." *J Orthop Res.* 19: 1122-1130.
- Küttner K.E.**, G. V. (1995). "Osteoarthritic Disorders." *American Academy of Orthopaedic Surgeons.*
- Küttner K.E.**, P. B., Gall G, Memoli VA, Schenk RK (1982). "Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, cell culture characteristics, and morphology." *J Cell Biol.*(93): 743-750.
- Kyriakis J.M.**, A. J. (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev.* 81(2): 807-69.
- Lang A.**, Horler, D., Baici, A. (2000). "The relative importance of cysteine peptidases in osteoarthritis." *J Rheumatol.* 27(8): 1970-1979.
- Lecaille F.**, C. Y., Brandt W, Li Z, Craik CS, Bromme D. (2002). "Selective inhibition of the collagenolytic activity of human cathepsin K by altering its S2 subsite specificity." *Biochemistry* 41(26): 8447-54.
- Lee J.W.**, Q. W., Scully SP (2002). "The involvement of beta1 integrin in the modulation by collagen of chondrocyte-response to Transforming growth factor-beta1." *J Orthop Res.* 20: 66-75.
- Lemaire R.**, Huet, G., Zerimech, F., Grard, G., Fontaine, C., Duquesnoy, B., and Flipo, R.M. (1997). "Selective Induction of the secretion of Cathepsin B and L by Cytokines in synovial Fibroblast-like cells." *British Journal of Rheumatology* 36: 735-743.
- Lenarcic B.**, K. I., Zunec P, Turk V (1996). "Differences in specificity for the interactions of stefins A, B and D with cysteine proteinases." *FEBS Lett.* 395(2-3): 113-8.
- Li Y.P.**, C. W. (1999). "Characterization of mouse cathepsin K gene, the gene promoter, and the gene expression." *J Bone Miner Res.* 14(4): 487-99.
- Li Z.**, H. W., Bromme D. (2000). "Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates." *Biochemistry.* 39(3): 529-36.
- Li Z.**, Y. Y., Li W, Bogoy M, Katz N, Gordon RE, Fields GB, Bromme D. (2004). "Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans." *J Biol Chem.* 279(7): 5470-9.
- Linebaugh B.**, Sameni, M., Day, NA., Sloane, BF., Keppler, D. (1999). "Exocytosis of active cathepsin B." *Eur. J. Biochem.* 264: 100-109.

- Lohmander L.S.**, Y. Y., Roos H, Kobayashi T, Yamada H, Shinmei M. (1996). "Procollagen II C-propeptide in joint fluid: changes in concentration with age, time after knee injury, and osteoarthritis." *J Rheumatol.* 23(10): 1765-9.
- Loser R.**, S. K., Dimmig E, Gutschow M. (2005). "Interaction of papain-like cysteine proteases with dipeptide-derived nitriles." *J Med Chem.* 48(24): 7688-707.
- Lucic D.**, M. J., Kilpatrick KE, Cole AA. (2003). "N-telopeptide of type II collagen interacts with annexin V on human chondrocytes." *Connect Tissue Res.* 44(5): 225-39.
- Matsumoto M.**, K. M., Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, Hisatake K, Nogi Y. (2004). "Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1." *J Biol Chem.* 279(44): 45969-79.
- Mayne R.** (1989). "Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease?" *Arthritis Rheum.* 32(3): 241-6.
- Mazzetti I.**, M. G., Paoletti S, Ugucioni M, Olivotto E, Vitellozzi R, Cattini L, Facchini A, Borzi RM. (2004). "A role for chemokines in the induction of chondrocyte phenotype modulation." *Arthritis Rheum.* 50(1): 112-22.
- Mendler M.**, E.-B. S., Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P. (1989). "Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI." *J Cell Biol.* 108(1): 191-7.
- Milner J.M.**, R. A., Cawston TE, Young DA (2006). "Metalloproteinase and inhibitor expression profiling of resorbing cartilage procollagenase activation as a critical step for collagenolysis." *Arthritis Res Ther.* 8(6): R142.
- Mollenhauer J.**, B. M., Lizarbe A, von der Mark K (1984). "Role of anchorin CII, a 31,000-mo.-wt membrane proteine, in the interaction of chondrocytes with type II collagen." *J Cell Biol.* 98: 1572-8.
- Mollenhauer J.**, M. M., King KB, Gupta M, Chubinskaya S, Koepp H, Cole AA. (1999). "Expression of anchorin CII (cartilage annexin V) in human young, normal adult, and osteoarthritic cartilage." *J Histochem Cytochem.* 47(2): 209-20.
- Mollenhauer J.**, and v. d. M. K. (1983). "Isolation and characterization of a collagen binding glycoprotein from chondrocyte membranes." *EMBO J.* 2: 45-50.
- Montaser M.**, L. G., Mach L. (2002). "CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells." *Biol Chem.* 383(7-8): 1305-8.

- Morko J.P.**, S. M., Saamanen AM, Salminen HJ, Vuorio EI. (2004). "Up regulation of cathepsin K expression in articular chondrocytes in a transgenic mouse model for osteoarthritis." *Ann Rheum Dis.* 63(6): 649-55.
- Mort J.S.**, M. M., Lee ER. (1998). "Cathepsin B: an alternative protease for the generation of an aggrecan 'metalloproteinase' cleavage neoepitope." *Biochem J.* 335(3): 491-4.
- Motychkova G.**, W. K., Horstmann M, Rieman DJ, Fisher DZ, Fisher DE. (2001). "Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10): 5798-803.
- Murphy G.**, and Reynolds, J. J. (1993). "Extracellular Matrix Degradation." In: *Connective Tissue and Its Heritable Disorders.*: 287 - 316.
- Murphy T.V.**, P. C., Kotsonis P, Iannazzo L, Majewski H (1999). "Structural determinants of phorbol ester binding in synaptosomes: pharmacokinetics and pharmacodynamics." *Eur J Pharmacol.* 381(1): 77-84.
- Newton A.C.**, J. J. (1998). "Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules." *Biochim Biophys Acta.* 1376(2): 155-72.
- Niethard F.U.**, P. J. (2003). *Orthopädie.* Stuttgart, Thieme Verlag.
- Okada Y.** (2000). "Matrix-degrading metalloproteinases and their role in joint destruction." *Mod. Rheumatol.* 10: 121-128.
- Parker P.J.**, M.-R. J. (2004). "PKC at a glance." *J Cell Sci.* 117(2): 131-2.
- Pelletier J.P.**, B. C., Boily M, Brunet J, Mineau F, Geng C, Reboul P, Laufer S, Lajeunesse D, Martel-Pelletier J. (2005). "The protective effect of licofelone on experimental osteoarthritis is correlated with the downregulation of gene expression and protein synthesis of several major cartilage catabolic factors: MMP-13, cathepsin K and aggrecanases." *Arthritis Res Ther.* 7(5): 1091-102.
- Pfäffle M.**, R. F., Hofmann H, Fernandez MP, Selmin O, Yamada Y, Garrone R, von der Mark K (1988). "The Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen-binding protein of the calpactin family." *EMBO Journal* 7(6): 2335-2342.
- Rantakokko J.**, A. H., Savontaus M, Vuorio E. (1996). " Mouse cathepsin K: cDNA cloning and predominant expression of the gene in osteoclasts, and in some hypertrophying chondrocytes during mouse development." *FEBS Lett.* 393(2-3): 307-13.
- Reid D.L.**, A. M., Mollenhauer J (2000). "Cell Attachment, Collagen Binding, and Receptor Analysis on Bovine Articular Chondrocytes." *J Orthop Res.* 18(3): 364-373.

- Reinheckel T.**, D. J., Roth W, Peters C. (2001). "Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L." *Biol Chem.* 382(5): 735-41.
- Rifkin B.**, Vernillo, A.T., Kleckner, A.P., Auszmann, J.M., Rosenberg, L.R., and Zimmerman, M. (1991). "Cathepsin B and L activities in isolated osteoclasts." *Biochemical and Biophysical Research communications* 179(1): 63-69.
- Rood J.A.**, V. H. S., Drake FH, Gowen M, Debouck C. (1997). "Genomic organization and chromosome localization of the human cathepsin K gene (CTSK)." *Genomics* 41(2): 169-76.
- Roth W.**, D. J., Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A, Schmidt P, Schmahl W, Scherer J, Anton-Lamprecht I, Von Figura K, Paus R, Peters C. (2000). "Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling." *FASEB J.* 14(13): 2075-86.
- Rothe G.**, Klingel, S., Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W., Zirkelbach, C., Banati, R.B., Mangel, W.F., and Valet, G. (1992). "Flow Cytometric Analysis of Protease Activities in Vital Cells." *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373: 547-554.
- Rouse J.**, C. P., Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." *Cell* 78(6): 1027-37.
- Ruiz-Romero C.**, L.-A. M., Blanco FJ. (2005). "Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases." *Proteomics*. 5(12): 3048-59.
- Saftig P.**, H. E., Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. (1998). "Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(23): 13453-8.
- Salter D.M.**, H. D., Simpson R, Gardner DL. (1992). "Integrin expression by human articular chondrocytes." *Br J Rheumatol.* 31(4): 231-4.
- Sandell L.J.**, A. T. (2001). "Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis." *Arthritis Res.* 3(2): 107-13.
- Schwartz W.N.**, B. A. "Human cathepsin H." *Biochem J.* 191(2): 487-97.
- Sentandreu M.A.**, A. L., Ouali A. (2003). "Purification of bovine cathepsin B: proteomic characterization of the different forms and production of specific antibodies." *Biochem Cell Biol.* 81(4): 317-26.

- Shakibaei M.**, D. S. P., Merker HJ (1997). "Integrin expression and collagen type II implicated maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture: an immunomorphological study." *Cell Biol Int.* 21(2): 115-125.
- Shi G.P.**, S. G., Grubb A, Ducharme A, Rhode LH, Lee RT, Ridker PM, Libby P, Chapman HA. (1999). "Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms." *J Clin Invest.* 104(9): 1191-7.
- Sires U.I.**, S. T., Fliszar CJ, Wang ZQ, Gluck SL, Welgus HG. (1995). "Complete degradation of type X collagen requires the combined action of interstitial collagenase and osteoclast-derived cathepsin-B." *J Clin Invest.* 95(5): 2089-95.
- Skoumal M.**, H. G., Kolarz G, Hawa G, Woloszczuk W, Klingler A. (2005). "Serum cathepsin K levels of patients with longstanding rheumatoid arthritis: correlation with radiological destruction." *Arthritis Res Ther.* 7(1): 65-70.
- Söderström M.**, Ekfors, T., Böhling, T., Aho, A., Aro, H.T., Vuorio, E. (2001). "Cysteine proteinases in chondrosarcomas." *Matrix Biology* 19: 717 - 725.
- Spiess E.**, Brüning, A., Gack, S., Ulbricht, B., Spring, H., Trefz, G., Ebert, W. (1994). "Cathepsin B Activity in Human Lung Tumor Cell Lines: Ultrastructural Localization, pH Sensitivity, and Inhibitor Status at the Cellular Level." *Histochem. Cytochem. J.* 42(7): 917 - 929.
- Stoka V.**, Turk, B., Schendel, SL., Kim, TH., Cirman, T., Snipas, SJ., Ellerby, LM, Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., Brömme, D., Krajewski, S., Reed, JC, Yin, XM, Turk, V., Salvesen, GS. (2001). "Lysosomal Protease Pathways to Apoptosis." *J. Biol. Chem.* 276(5): 3149-3157.
- Taubert H.**, R. D., Kehlen A, Meye A, Bartel F, John V, Brandt J, Bache M, Wurl P, Schmidt H, Weber E. (2002). "Expression of cathepsin B, D and L protein in juvenile idiopathic arthritis." *Autoimmunity* 35(3): 221-4.
- Tezuka K.**, Tezuka, Y., Maejima, A., Sato, T., Nemoto, K., Kamioka, H., and Y. Hakeda, Kumegawa, M. (1994). "Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts." *J. Biol. Chem.* 269: 1106 - 1109.
- Towatari T.**, Nikawa, T., Murata, M., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., and N. Katunuma (1991). "Novel epoxysuccinyl peptides: A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo." *FEBS Letters* 280(2): 311-315.
- Turk B.**, Turk D, Turk V (2000). "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers." *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2):98-111.

- Ulbricht B.**, Spiess, E., Schwartz-Albiez, R., and Ebert, W. (1995). "Quantification of Intracellular Cathepsin Activities in Human Lung Tumor Cell Lines by Flow Cytometry." *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376: 407-414.
- Upholt W.B.**, S. C., Sandell L.J. (1985). "Structure of the type II collagen gene." *Ann N Y Acad Sci.* 460: 130-40.
- Uusitalo H.**, H. A., Soderstrom M, Aro HT, Vuorio E. (2000). "Expression of cathepsins B, H, K, L, and S and matrix metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus." *Calcif Tissue Int.* 67(5): 382-90.
- Van Noorden C.J.F.**, J. T., Van Marle J, Bissell ER, Griffini P, Jans M, Snel J, Smith RE. (1998). "Heterogeneous suppression of experimentally induced colon cancer metastasis in rat liver lobes by inhibition of extracellular cathepsin B." *Clin Exp Metastasis* 16(2): 159-67.
- Van Noorden C. J. F.**, Vogels, I.M.C., Everts, V., and Beertsen, W. (1987). "Localisation of cathepsin B activity in fibroblasts and chondrocytes by continuous monitoring of the formation of a final fluorescent reaction product using 5-nitroso-salicylaldehyde." *Histochem. J.* 19: 483-487.
- Villar-Suarez V.**, C. B., Calles-Venal I, Bravo IG, Fernandez-Alvarez JG, Fernandez-Caso M, Villar-Lacilla JM. (2005). "Effects of extracellular matrix on the morphology and behaviour of rabbit articular chondrocytes in culture." *J Biomed Biotechnol.* 4: 364-73.
- von der Mark K.**, M. J., Müller PK, Pfäffle M (1985). "Anchorin CII, a type II collagen-binding glycoprotein from chondrocyte membranes." *Ann N Y Acad Sci.*(460): 214-23.
- Wagner B.M.**, S. R., Coles PJ, Copp LJ, Ernest MJ, Krantz A. (1994). "In vivo inhibition of cathepsin B by peptidyl (acyloxy)methyl ketones." *J Med Chem.* 37(12): 1833-40.
- Wang D.**, P. M., Li W, Kopeckova P, Bromme D, Kopecek J. (2002). "Inhibition of cathepsin K with lysosomotropic macromolecular inhibitors." *Biochemistry* 41(28): 8849-59.
- Wieczerzak E.**, D. P., Lankiewicz L, Oldziej S, Grzonka Z, Abrahamson M, Grubb A, Bromme D. (2002). "Azapeptides structurally based upon inhibitory sites of cystatins as potent and selective inhibitors of cysteine proteases." *J Med Chem.* 45(19): 4202-11.
- Xia L.**, Kilb, J., Wex, H., Li, Z., Lipyansky, A., Breuil, V., Stein, L., Palmer, JT., Dempster, DW., Brömme, D. (1999). "Localizazion of Rat Cathepsin K in Osteoclasts and Resorption Pits: Inhibition of Bone Resorption and Cathepsin K-Activity by Peptidyl Vinyl Sulfones." *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 380: 679-687.
- Xing R.**, Addington, AK., Mason, RW. (1998). "Quantification of cathepsins B and L in cells." *Biochem. J.* 332: 499-505.

- Yamashita D.S.**, D. R. (2000). "Cathepsin K and the design of inhibitors of cathepsin K." *Curr Pharm Des.* 6(1): 1-24.
- Yang C.**, L. S., Helminen HJ, Khillan JS, Bao Y, Prockop DJ (1997). "Apoptosis of chondrocytes in transgenic mice lacking collagen II." *Exp Cell Res.* 235(2): 370-3.
- Yasuda Y.**, K. J., Bromme D (2005). "The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics." *Adv Drug Deliv Rev.* 57(7): 973-93.
- Zuscik M.J.**, D. S. M., Gunter KK, Gunter TE, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Puzas JE, Rosier RN (2003). Annexin V regulation and function during chondrocyte maturation. *Trans Orthop Res Soc.*
- Zwicky R.**, M. K., Goldring MB, Baici A. (2002). "Cathepsin B expression and down-regulation by gene silencing and antisense DNA in human chondrocytes." *Biochem J.* 367(1): 209-17.

8 Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Biochemie des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Direktor: Prof. Dr. Bernd Wiederanders) und der Forschungsabteilung des Waldkrankenhauses „Rudolf Elle“ gGmbH mit Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. R.A. Venbrocks) in der Zeit von Januar 2003 bis Dezember 2006 angefertigt.

Mein herzlichster Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Bernd Wiederanders für die Überlassung des Themas, das allzeit offene Ohr für meine Fragen, die wertvolle Hilfe sowie die fachliche und menschliche Unterstützung.

Herrn Prof. Rudolf A. Venbrocks bin ich für die Bereitschaft zur Aufnahme in das Forschungslabor am Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ und für das Interesse an meiner Arbeit zu Dank verpflichtet.

Bei Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Jürgen Mollenhauer bedanke ich mich für die vielen Antworten zum Thema Knorpel und die praktische Unterstützung.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie und des Waldkrankenhauses „Rudolf Elle“ für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Namentlich bedanken möchte ich mich:

- bei Frau Jana Schömburg für die unschätzbare Hilfe in allen Laborfragen.
- bei Frau Susann Schüler für die Einführung in die quantitative Real time PCR und die Unterstützung bei der Durchführung des Seminars.
- bei Frau Jana Neuwirth für die anregenden Diskussionen.
- bei Frau Seul für die stete Hilfe u.a. bei der Präparation von Lymphozyten.
- bei der EDV-Abteilung in Eisenberg, insbesondere bei Frau Kellner, für die freundliche und schnelle Hilfe.
- bei Hardi Hauk für die Bereitstellung von Röntgenbildern und OP-Aufnahmen.

Jana I, Jana II, Andrea, Steffi, Cordula und Ulrike danke ich für die schöne Gemeinschaft, für viele Lichtblicke und gute Laune.

Für die finanzielle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danke ich dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) an der Medizinischen Fakultät der FSU Jena und dem Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI) an der Universität Tübingen.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken, auf deren bedingungslose Unterstützung ich mich stets verlassen konnte.

Allen, die ich vielleicht vergessen habe, gilt dieses DANKE.

9 Erklärungen

9.1 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne Inanspruchnahme unerlaubter fremder Hilfe angefertigt habe. Ich habe nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen zur Anfertigung dieser Arbeit eingesetzt und alle Materialien oder Dienstleistungen, die ich von Dritten erhalten habe, als solche gekennzeichnet.

Bürgel, den 14.03.2007

Anke Rüttger

9.2. Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung des Verfahrens zum Erwerb des o.g. Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Bürgel, den 14.03.2007

Anke Rüttger

10 Lebenslauf

DIPL. BIOCHEM. ANKE RÜTTGER (geb. Köcher)
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Institut für Biochemie, Universitätsklinikum,
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Geboren: 14. November 1978 in Jena
Verheiratet, 1 Kind (Hugo, 3 Jahre)

AUSBILDUNG

Schulausbildung:

09/1985 - 06/1991	Polytechnische Oberschule „Magnus Poser“ Bürgel
09/1991 - 06/1997	Friedrich-Schiller-Gymnasium Eisenberg (Gesamtnote: 1,6)

Studium:

10/1997 – 10/2002	Diplomstudiengang: Biochemie / Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
11/2001 – 08/2002	Diplomarbeit "Visualisierung und Bestimmung der Aktivität der Cathepsine B, H,K und L in vitalen Zellen", Note: 1,0 (sehr gut)
10/2002	Studienabschluss als Diplombiochemikerin, Gesamtnote: 1,3 (sehr gut)

Promotionsstudium / berufliche Tätigkeit:

01/2003 – 05/2004	Forschungsabteilung am Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ gGmbH Eisenberg mit Lehrstuhl für Orthopädie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena Wissenschaftliche Mitarbeiterin (bei PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Jürgen Mollenhauer) <ul style="list-style-type: none">- Planung, Durchführung und Auswertung von Versuchen- Erstellung von Berichten und Präsentationen
06/2004 – 05/2007	Institut für Biochemie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Wissenschaftliche Mitarbeiterin (bei Prof. Dr. Bernd Wiederanders) <ul style="list-style-type: none">- Lehrbeteiligung (Seminarleiter für Studenten der Humanmedizin im Fach Biochemie, Betreuung von Doktoranden und Studentenpraktika)- Planung, Durchführung und Auswertung von Versuchen- Erstellung von Berichten, Verfassung von Publikationen und Präsentationen

Weiterbildung:

2007

Sicherheitsaspekte der Gentechnik - Fortbildungsveranstaltung nach §15 Abs. 4 Satz 2 GenTSV für Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit (Fernlehrgang); Hamburg-Akademie

KONFERENZ-ABSTRACTS

1. Köcher A, Mollenhauer J, Wiederanders B: Visualization and Quantification of Cathepsin B-, K- and L-activity in living cells. Joint Annual Meeting of the German and Swiss Connective Tissue Research Society, Ulm, 2003.
2. Köcher A, Mollenhauer J, Wiederanders B: Visualisierung und Quantifizierung der Cathepsin B-, K- und L-Aktivität in vitalen Knorpelzellen. DGOOC, Berlin, 2003.
3. Köcher A, Mollenhauer J, Wiederanders B: Visualization and quantification of cathepsin B, H, K and L activities in viable cells. 21st Winter School, Tiers (Italien), 2004.
4. Köcher A, Mollenhauer J, Wiederanders B: Visualization and quantification of cathepsin B, H, K and L activities in viable cells. Joint Annual Meeting of the German and Swiss Connective Tissue Research Society, Jena, 2004.
5. Köcher A, Mollenhauer J, Wiederanders B: The role of cathepsins in cartilage metabolism. BioStar First International Congress on Regenerative Biology, Stuttgart, 2004.
6. Rüttger A, Müller C, Mollenhauer J, Wiederanders B: Untersuchungen zur Expression von Proteasen in humanen Chondrozyten von Patienten mit Gonarthrose. DGOOC, Berlin, 2005.
7. Rüttger A, Müller C, Mollenhauer J, Wiederanders B: The role of cathepsins in osteoarthritis: mRNA-expression, protein verification and enzyme activities. 23rd Winter School, Tiers (Italien), 2006.

11 Anhang

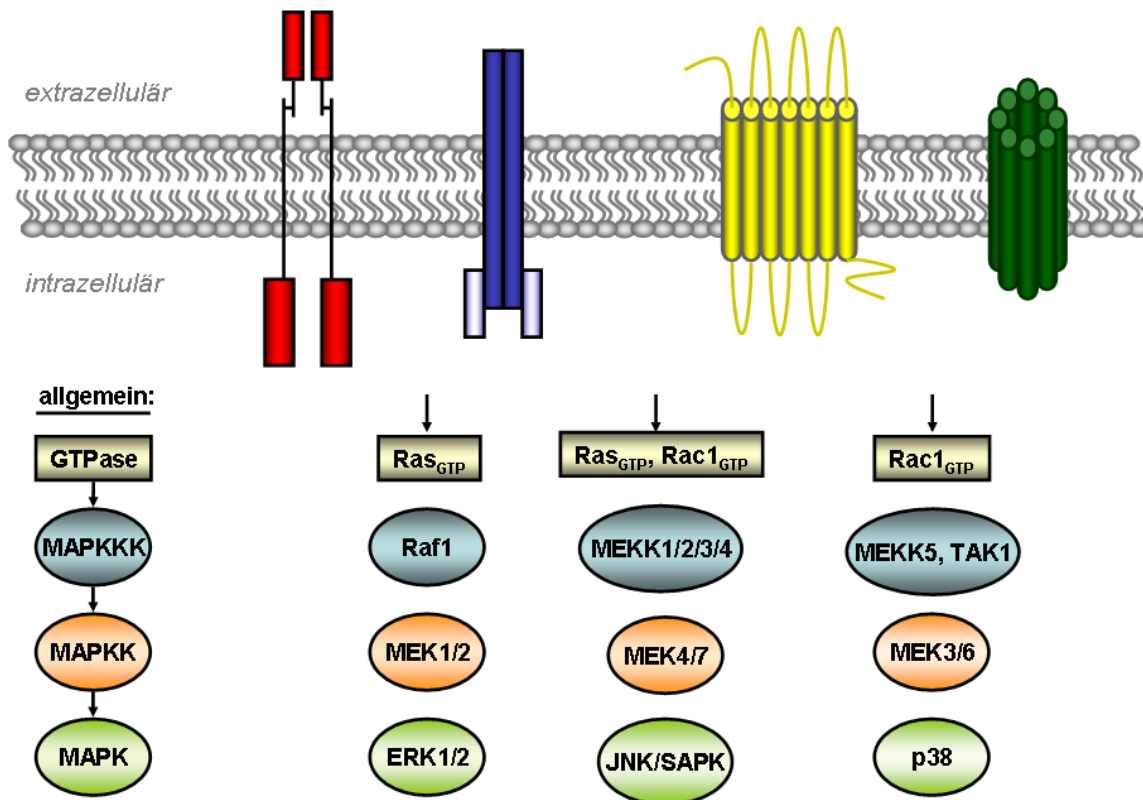


Abb. A1: Schematische Darstellung der Permutationen der MAPK [modifiziert nach Krauss].

Die bisher am besten untersuchten MAPK-Wege sind der ERK-, der JNK/SAPK- und der p38-Weg. Die Aufgabe der Signalweiterleitung ins Zellinnere übernehmen Transmembranrezeptoren (rot: Rezeptoren mit intrinscher Tyrosinkinaseaktivität, blau: Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinaseaktivität, gelb: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, grün: Ionenkanäle). Eine ausschließliche Zuordnung der Rezeptortypen zu bestimmten Wegen ist aufgrund der Vielfältigkeit der Liganden, der ausgelösten Effekte und dem Crosstalk zwischen den verschiedenen Signalwegen nicht möglich. Den regulatorischen GTPasen, insbesondere dem Ras-Protein, kommen als zentrale Schaltstationen eine besonders wichtige Rolle bei der Aktivierung der MAPKKK zu. Alle drei Subtypen der MAPK-Wege nutzen zur Signalübertragung sequentiell hintereinandergeschaltete Proteinkinasen. Die Effektoren der MAPK (ERK1/2, JNK/SAPK, p38) sind weitere Kinasen und oder Transkriptionsfaktoren. Diese Abbildung soll die Einordnung der in Abb. A2 gezeigten Ergebnisse erleichtern.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ARAF	ATF2	BRAF	CCNA1	CCNA2	CCNB1	CCNB2	CCND1	CCND2	CCND3	CCNE1	CDC42
B	CDK2	CDK4	CDK6	CDKN1A	CDKN1B	CDKN1C	CDKN2A	CDKN2B	CDKN2C	CDKN2D	CHUK	COL1A1
C	CREB1	CREBBP	DLK1	E2F1	EGFR	EGR1	ELK1	ETS1	ETS2	FOS	GRB2	HRAS
D	HSPA5	HSPB1	JUN	KRAS	KSR1	MAP2K1	MAP2K1IP1	MAP2K2	MAP2K3	MAP2K4	MAP2K5	MAP2K6
E	MAP2K7	MAP3K1	MAP3K2	MAP3K3	MAP3K4	MAP4K1	MAPK1	MAPK10	MAPK11	MAPK12	MAPK13	MAPK14
F	MAPK3	MAPK6	MAPK7	MAPK8	MAPK8IP2	MAPK9	MAPKAPK2	MAPKAPK3	MAX	MEF2C	MKNK1	MOS
G	MST1	MYC	NFATC4	NRAS	PAK1	PRDX6	RAC1	RAF1	RB1	SFN	SMAD4	TP53
H	18SrRNA	HPRT1	RPL13A	GAPDH	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB

- $2^{\Delta\Delta Ct}$: > 1,3 Mio.
- $2^{\Delta\Delta Ct}$: > 250
- $2^{\Delta\Delta Ct}$: > 10
- $2^{\Delta\Delta Ct}$: $\geq 0,18$
- $2^{\Delta\Delta Ct}$: $\leq 0,12$

Abb. A2: Untersuchung zur aktivierenden Wirkung des synthetischen N-Telopeptids des Typ II Kollagen auf die p38 MAPK-Kaskade.

Humane Chondrozyten einer Patientin mit Osteoarthritis (73 Jahre alt) wurden aus dem Knorpelgewebe isoliert. Nach einer Stimulation für 12 h mit 0 mg/ml Ntelo und 1mg/ml Ntelo wurde jeweils die RNA isoliert. Die Analyse der cDNA erfolgte mit dem RT² Profiler™ PCR Array Human MAP Kinase Signaling Pathway. Die Abbildung zeigt die vergleichende Auswertung beider Experimente. Mit den Farben Dunkelrot, Orange und Gelb sind die Gene gekennzeichnet die in der mit Ntelo stimulierten Probe hochreguliert sind. Die mit weiß unterlegten Gene zeigen keine Unterschiede zwischen den Proben. Mit der Farbe Grün sind die Gene dargestellt, die in der Ntelo-stimulierten Probe runterreguliert sind. Detaillierte Angaben über die untersuchten Gene sind der Tabelle A1 zu entnehmen.

Tabelle A1: Gene Table (RT² Profiler™ PCR Array Human MAP Kinase Signaling Pathway)
 (Quelle: www.superarray.com)

Position	Unigene	GeneBank	Symbol	Description	Gene Name
A01	Hs.446641	NM_001654	ARAF	V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog	A-RAF/ARAF1
A02	Hs.425104	NM_001880	ATF2	Activating transcription factor 2	CRE-BP1/CREB2
A03	Hs.490366	NM_004333	BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	B-raf 1/BRAF1
A04	Hs.417050	NM_003914	CCNA1	Cyclin A1	Cyclin A1
A05	Hs.85137	NM_001237	CCNA2	Cyclin A2	CCN1/CCNA
A06	Hs.23960	NM_031966	CCNB1	Cyclin B1	CCNB
A07	Hs.194698	NM_004701	CCNB2	Cyclin B2	HsT17299
A08	Hs.523852	NM_053056	CCND1	Cyclin D1	BCL1/D11S287E
A09	Hs.376071	NM_001759	CCND2	Cyclin D2	KIAK0002
A10	Hs.534307	NM_001760	CCND3	Cyclin D3	Cyclin D3
A11	Hs.244723	NM_001238	CCNE1	Cyclin E1	CCNE
A12	Hs.467637	NM_001791	CDC42	Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	CDC42Hs/G25K
B01	Hs.19192	NM_001798	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	p33(CDK2)
B02	Hs.95577	NM_000075	CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	CMM3/PSK-J3
B03	Hs.119882	NM_001259	CDK6	Cyclin-dependent kinase 6	PLSTIRE
B04	Hs.370771	NM_000389	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CAP20/CDKN1
B05	Hs.238990	NM_004064	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	CDKN4/KIP1
B06	Hs.106070	NM_000076	CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	BWCR/BWS
B07	Hs.512599	NM_000077	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	ARF/CDK4I
B08	Hs.72901	NM_004936	CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	INK4B/MTS2
B09	Hs.525324	NM_078626	CDKN2C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	INK4C/p18
B10	Hs.435051	NM_001800	CDKN2D	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	INK4D/p19
B11	Hs.198998	NM_001278	CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	IKBKA/IKK-alpha
B12	Hs.172928	NM_000088	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	OI4/aa 694-711
C01	Hs.516646	NM_004379	CREB1	CAMP responsive element binding protein 1	CREB
C02	Hs.459759	NM_004380	CREBBP	CREB binding protein (Rubinstein-Taybi syndrome)	CBP/RSTS
C03	Hs.533717	NM_003836	DLK1	Delta-like 1 homolog (Drosophila)	FA1/PREF1
C04	Hs.96055	NM_005225	E2F1	E2F transcription factor 1	E2F-1/RBBP3
C05	Hs.488293	NM_005228	EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	ERBB/ERBB1
C06	Hs.326035	NM_001964	EGR1	Early growth response 1	AT225/G0S30
C07	Hs.181128	NM_005229	ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family	Elk1
C08	Hs.369438	NM_005238	ETS1	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	ETS-1/EWSR2
C09	Hs.517296	NM_005239	ETS2	V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	c-Ets2
C10	Hs.25647	NM_005252	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	c-fos
C11	Hs.444356	NM_002086	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	ASH/EGFRBP-GRB2
C12	Hs.37003	NM_005343	HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	HRAS1/K-ras

D01	Hs.522394NM_005347	HSPA5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	BIP/GRP78
D02	Hs.520973NM_001540	HSPB1	Heat shock 27kDa protein 1	CMT2F/DKFZp586P1322
D03	Hs.525704NM_002228	JUN	V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	AP1
D04	Hs.505033NM_004985	KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	C-K-RAS/K-RAS2A
D05	Hs.133534NM_014238	KSR1	Kinase suppressor of ras 1	KSR/RSU2
D06	Hs.145442NM_002755	MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAPKK1/MEK1
D07	Hs.433332NM_021970	MAP2K1IP1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1 interacting protein 1	MP1
D08	Hs.465627NM_030662	MAP2K2	Mitogen-activated protein kinase kinase 2	MAPKK2/MEK2
D09	Hs.514012NM_002756	MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAPKK3/MEK3
D10	Hs.514681NM_003010	MAP2K4	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	JNKK/JNKK1
D11	Hs.114198NM_002757	MAP2K5	Mitogen-activated protein kinase kinase 5	HsT17454/MAPKK5
D12	Hs.463978NM_002758	MAP2K6	Mitogen-activated protein kinase kinase 6	MAPKK6/MEK6
E01	Hs.531754NM_145185	MAP2K7	Mitogen-activated protein kinase kinase 7	Jnkk2/MAPKK7
E02	Hs.508461XM_042066	MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAPKKK1/MEKK
E03	Hs.145605NM_006609	MAP3K2	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	MEKK2/MEKK2B
E04	Hs.29282NM_002401	MAP3K3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	MAPKKK3/MEKK3
E05	Hs.390428NM_005922	MAP3K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	MAPKKK4/MEKK4
E06	Hs.95424NM_007181	MAP4K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1	HPK1
E07	Hs.431850NM_002745	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	ERK/ERK2
E08	Hs.125503NM_002753	MAPK10	Mitogen-activated protein kinase 10	JNK3/JNK3A
E09	Hs.57732NM_002751	MAPK11	Mitogen-activated protein kinase 11	P38B/P38BETA2
E10	Hs.432642NM_002969	MAPK12	Mitogen-activated protein kinase 12	ERK3/ERK6
E11	Hs.178695NM_002754	MAPK13	Mitogen-activated protein kinase 13	PRKM13/SAPK4
E12	Hs.485233NM_001315	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	CSBP1/CSBP2
F01	Hs.861NM_002746	MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	ERK1/P44ERK1
F02	Hs.411847NM_002748	MAPK6	Mitogen-activated protein kinase 6	DKFZp686F03189/ERK3
F03	Hs.150136NM_002749	MAPK7	Mitogen-activated protein kinase 7	BMK1/ERK4
F04	Hs.522924NM_002750	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	JNK/JNK1
F05	Hs.356523NM_012324	MAPK8IP2	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	IB2/JIP2
F06	Hs.484371NM_002752	MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9	JNK-55/JNK2
F07	Hs.519276NM_004759	MAPKAPK2	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	MAPKAPK-2
F08	Hs.234521NM_004635	MAPKAPK3	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	3PK/MAPKAP3
F09	Hs.285354NM_002382	MAX	MYC associated factor X	orf1
F10	Hs.444409NM_002397	MEF2C	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)	MEF2C
F11	Hs.576738NM_003684	MKNK1	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1	MNK1
F12	Hs.533432NM_005372	MOS	V-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog	MSV
G01	Hs.512587NM_020998	MST1	Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	D3F15S2/DNF15S2
G02	Hs.202453NM_002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	c-Myc
G03	Hs.77810NM_004554	NFATC4	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4	NF-ATc4/NFAT3
G04	Hs.486502NM_002524	NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	N-ras/NRAS1

G05	Hs.435714	NM_002576	PAK1	P21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast)	PAKalpha
G06	Hs.120	NM_004905	PRDX6	Peroxiredoxin 6	1-Cys/AOP2
G07	Hs.413812	NM_006908	RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	MIG5/TC-25
G08	Hs.159130	NM_002880	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	CRAF/Raf-1
G09	Hs.408528	NM_000321	RB1	Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	OSRC/RB
G10	Hs.523718	NM_006142	SFN	Stratifin	14-3-3
G11	Hs.75862	NM_005359	SMAD4	SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)	DPC4/JIP
G12	Hs.408312	NM_000546	TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	LFS1/TRP53
H01	N/A	X03205	18SrRNA	Human 18S ribosomal RNA	18SRNA
H02	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)	HGPRT/HPRT
H03	Hs.546356	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A
H04	Hs.544577	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD
H05	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
H06	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
H07	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
H08	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
H09	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
H10	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
H11	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
H12	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin

12 Autorenvereinbarungen

12.1 Mitautorenschaft von Prof. Dr. Michael Gütschow

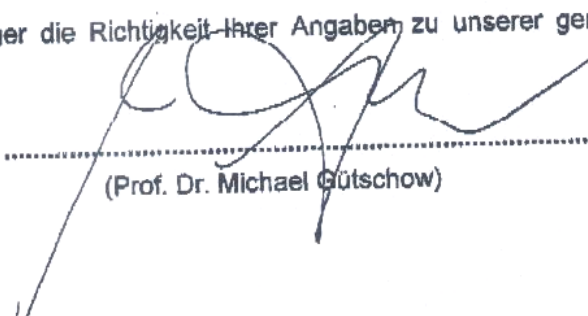
Gemeinsame Publikation:

Rüttger A, Mollenhauer J, Löser R, **Gütschow M**, Wiederanders B (2006) Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. **Veröffentlicht in der Zeitschrift „BioTechniques“ 41 (4): 469-73.**

Eigenanteil von Anke Rüttger an der o.g. Publikation:

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Pflege von HEK293-Zellen, Präparation und Pflege von primären Chondrozyten	100%
Biochemie I	Entwicklung des Cathepsin-Assays, Western Blot-Analyse der Cathepsine	100%
Biochemie II	Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Cathepsine B, H, K und L	0%
Chemie	Synthese des Cathepsin K Inhibitors Z-LG- $\psi\{C\equiv N\}$	0%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	95%
	Anfertigung des Manuskripts	50%

Hiermit bestätige ich Frau Anke Rüttger die Richtigkeit ihrer Angaben zu unserer gemeinsamen Veröffentlichung.



.....
(Prof. Dr. Michael Gütschow)

12.2 Mitautorenschaft von Dr. Reik Löser

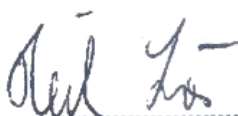
Gemeinsame Publikation:

Rüttger A, Mollenhauer J, **Löser R**, Gütschow M, Wiederanders B (2006) Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. **Veröffentlicht in der Zeitschrift „BioTechniques“ 41 (4): 469-73.**

Eigenanteil von Anke Rüttger an der o.g. Publikation:

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Pflege von HEK293-Zellen, Präparation und Pflege von primären Chondrozyten	100%
Biochemie I	Entwicklung des Cathepsin-Assays, Western Blot-Analyse der Cathepsine	100%
Biochemie II	Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Cathepsine B, H, K und L	0%
Chemie	Synthese des Cathepsin K Inhibitors Z-LG- $\psi\{C\equiv N\}$	0%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	95%
	Anfertigung des Manuskripts	50%

Hiermit bestätige ich Frau Anke Rüttger die Richtigkeit Ihrer Angaben zu unserer gemeinsamen Veröffentlichung.



(Dr. Reik Löser)

12.3 Mitautorenschaft von PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Jürgen Mollenhauer

Gemeinsame Publikationen:

- A) Rüttger A, **Mollenhauer J**, Löser R, Gütschow M, Wiederanders B (2006) Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. **Veröffentlicht in der Zeitschrift „BioTechniques“ 41 (4): 469-73.**
- B) Rüttger A, **Mollenhauer J**, Wiederanders B (2007) The role of cathepsins in osteoarthritis: collagen fragments up-regulate cathepsin expression and activity in normal and osteoarthritic chondrocytes by utilizing PKC-dependent signalling. **Zur Publikation eingereicht bei der Zeitschrift „Arthritis and Rheumatism“.**

Eigenanteil von Anke Rüttger an der Publikation (A):

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Pflege von HEK293-Zellen, Präparation und Pflege von primären Chondrozyten	100%
Biochemie I	Entwicklung des Cathepsin-Assays, Western Blot-Analyse der Cathepsine	100%
Biochemie II	Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Cathepsine B, H, K und L	0%
Chemie	Synthese des Cathepsin K Inhibitors Z-LG- $\psi\{C\equiv N\}$	0%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	95%
	Anfertigung des Manuskripts	50%

Eigenanteil von Anke Rüttger an der Publikation (B):

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Präparation und Pflege von primären Chondrozyten boviner und humaner Herkunft, Stimulationsexperimente	100%
Biochemie I	Durchführung des Cathepsin-Assays, Analyse der Signaltransduktion (Western Blots)	100%
Biochemie II	Präparation der nativen Kollagenfragmente	0%
Molekularbiologie	RNA-Isolation, quantitative Real-Time PCR, PCR-Arrays	100%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	95%
	Anfertigung des Manuskripts	60%

Hiermit bestätige ich Frau Anke Rüttger die Richtigkeit Ihrer Angaben zu unseren gemeinsamen Veröffentlichungen.


 (PD Dr. Jürgen Mollenhauer)

12.4 Mitautorenschaft von cand. Dr. med. Christina Müller

Gemeinsame Publikation:

Müller C, Wiederanders B, Fuhrmann R, Venbrocks RA, Rüttger A (2007).
Intraartikulärer Schmerz bei Gonarthrose: Ein Fallbericht über eine stark erhöhte
Expression der Cathepsine in Chondrozyten **Zur Publikation eingereicht bei der**
„Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete“.

Eigenanteil von Anke Rüttger an der o.g. Publikation:

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Präparation und Pflege von primären Chondrozyten humaner Herkunft	100%
Biochemie I	Durchführung des Cathepsin-Assays	100%
Molekularbiologie	RNA-Isolation, quantitative Real-Time PCR	0%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	70%
	Anfertigung des Manuskripts	50%

Hiermit bestätige ich Frau Anke Rüttger die Richtigkeit Ihrer Angaben zu unserer gemeinsamen Veröffentlichung.

.....
(cand. Dr. med. Christina Müller)

12.5 Mitautorenschaft von PD Dr. Renée Fuhrmann

Gemeinsame Publikation:

Müller C, Wiederanders B, **Fuhrmann R**, Venbrocks RA, Rüttger A (2007).
Intraartikulärer Schmerz bei Gonarthrose: Ein Fallbericht über eine stark erhöhte
Expression der Cathepsine in Chondrozyten **Zur Publikation eingereicht bei der**
„Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete“.

Eigenanteil von Anke Rüttger an der o.g. Publikation:

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Präparation und Pflege von primären Chondrozyten humaner Herkunft	100%
Biochemie I	Durchführung des Cathepsin-Assays	100%
Molekularbiologie	RNA-Isolation, quantitative Real-Time PCR	0%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	70%
	Anfertigung des Manuskripts	50%

Hiermit bestätige ich Frau Anke Rüttger die Richtigkeit Ihrer Angaben zu unserer gemeinsamen Veröffentlichung.


.....
(PD Dr. Renée Fuhrmann)

12.6 Mitautorenschaft von Prof. Dr. Rudolf-Albrecht Venbrocks

Gemeinsame Publikation:

Müller C, Wiederanders B, Fuhrmann R, **Venbrocks RA**, Rüttger A (2007).
Intraartikulärer Schmerz bei Gonarthrose: Ein Fallbericht über eine stark erhöhte
Expression der Cathepsine in Chondrozyten **Zur Publikation eingereicht bei der**
„Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete“.

Eigenanteil von Anke Rüttger an der o.g. Publikation:

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Präparation und Pflege von primären Chondrozyten humaner Herkunft	100%
Biochemie I	Durchführung des Cathepsin-Assays	100%
Molekularbiologie	RNA-Isolation, quantitative Real-Time PCR	0%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	70%
	Anfertigung des Manuskripts	50%

Hiermit bestätige ich Frau Anke Rüttger die Richtigkeit Ihrer Angaben zu unserer gemeinsamen Veröffentlichung.


.....
(Prof. Dr. Rudolf-Albrecht Venbrocks)

12.7 Mitautorenschaft von Prof. Dr. Bernd Wiederanders

Gemeinsame Publikationen:

A) Rüttger A, Mollenhauer J, Löser R, Gütschow M, **Wiederanders B** (2006) Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. **Veröffentlicht in der Zeitschrift „BioTechniques“ 41 (4): 469-73.**

B) Rüttger A, Mollenhauer J, **Wiederanders B** (2007) The role of cathepsins in osteoarthritis: collagen fragments up-regulate cathepsin expression and activity in normal and osteoarthritic chondrocytes by utilizing PKC-dependent signalling. **Zur Publikation eingereicht bei der Zeitschrift „Arthritis and Rheumatism“.**

C) Müller C, **Wiederanders B**, Fuhrmann R, Venbrocks RA, Rüttger A (2007). Intraartikulärer Schmerz bei Gonarthrose: Ein Fallbericht über eine stark erhöhte Expression der Cathepsine in Chondrozyten **Zur Publikation eingereicht bei der „Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete“.**

D) Rüttger A, **Wiederanders B** (2007) Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamide. **Zur Publikation angenommen in dem Buch "Current Protocols in Protein Science".**

Eigenanteil von Anke Rüttger an den Publikation (A und D):

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Pflege von HEK293-Zellen, Präparation und Pflege von primären Chondrozyten	100%
Biochemie I	Entwicklung des Cathepsin-Assays, Western Blot-Analyse der Cathepsine	100%
Biochemie II	Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Cathepsine B, H, K und L	0%
Chemie	Synthese des Cathepsin K Inhibitors Z-LG- $\psi\{C\equiv N\}$	0%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	95%
	Anfertigung des Manuskripts	50%

Autorenvereinbarungen

Eigenanteil von Anke Rüttger an der Publikation (B):

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Präparation und Pflege von primären Chondrozyten boviner und humaner Herkunft, Stimulationsexperimente	100%
Biochemie I	Durchführung des Cathepsin-Assays, Analyse der Signaltransduktion (Western Blots)	100%
Biochemie II	Präparation der nativen Kollagenfragmente	0%
Molekularbiologie	Quantitative Real-Time PCR, PCR-Arrays	100%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	95%
	Anfertigung des Manuskripts	60%

Eigenanteil von Anke Rüttger an der Publikation (C):

	Tätigkeit	Eigenanteil
Zellkultur	Präparation und Pflege von primären Chondrozyten humaner Herkunft	100%
Biochemie	Durchführung des Cathepsin-Assays	100%
Molekularbiologie	RNA-Isolation, quantitative Real-Time PCR	0%
Präsentation	Analyse und Auswertung der Daten	70%
	Anfertigung des Manuskripts	50%

Hiermit bestätige ich Frau Anke Rüttger die Richtigkeit Ihrer Angaben zu unseren gemeinsamen Veröffentlichungen.

.....
(Prof. Dr. Bernd Wiederanders)